

**Utilização de indicadores de atividade microbiana na
avaliação da remediação de solos degradados por
atividades mineiras – Caso de estudo da utilização de
cinzas de biomassa e lamas biológicas da indústria da
pasta de papel**

Neusa Maria Rodrigues Semedo

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente

Orientadora: Professora Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Orientadora: Professora Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga

Júri:

Presidente: Doutora Cláudia Marques dos Santos Cordovil, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Patrícia Alexandra Dias Brito Palma, Professora Adjunta da Escola Superior Agrária, do Instituto Politécnico de Beja.

Lisboa, 2020

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade, força, saúde e coragem que me concedeu, para que eu hoje possa afirmar: “Consegui”.

Às minhas Professoras e orientadoras, Dra. Mariana Mota e Dra. Paula Alvarenga, por todo o apoio e conhecimentos transmitidos. Agradeço-lhes, sobretudo, por terem aceite orientar-me e pela disponibilidade que revelaram ao longo deste trabalho.

A luz da minha vida, a minha querida e adorada mãe. Obrigada mamã, pelo teu amor incondicional, carinho e por todos os ensinamentos. Sua trajetória de vida e força são as minhas maiores referências.

A minha querida Família: irmãos, irmãs, sobrinhas(os), pai, avó, tios(as), primas(os) e cunhados(as), pelo apoio incondicional que me deram e dão, em todas as fases da minha vida. A minha querida cadela Diana, pelo amor, carinho e por ser a minha fiel companheira, sobretudo, nas constantes madrugadas de estudos.

Ao meu querido amigo e companheiro de laboratório Eustáqui, pela amizade, carinho, conselhos e por sempre me aturar.

Ao meu querido amigo Samuel, pela ajuda, ânimo e crédito que me motivaram a concluir este trabalho.

Ao Jorge, pela sua dedicação, companheirismo, carinho, conselhos e incentivos. Por sempre acreditares em mim e principalmente pela sua paciência para comigo.

Aos meus queridos amigos e colegas de turma, pela amizade, compreensão e apoio demonstrado ao longo destes cinco anos de luta. Um obrigada especial as minhas queridas amigas, Ana Karina, Nádia, Joana e o ao meu querido Artur.

Quero também agradecer à toda comunidade Africana do ISA, pela força, amizade e ânimo que sempre me transmitiram, com um especial obrigada aos meus queridos(as) amigos(as), Dara, Cátia, Antônia, Rízia, Ivana, Luís, Alister, Paulino e Guilengue.

A todos os Professores e Funcionários do Instituto Superior de Agronomia, nomeadamente da Biblioteca, Seguranças, Senhoras das limpezas, Cafés, Bares, Divisão Académica e um especial obrigada, às queridas funcionárias do Laboratório de Biologia Molecular e Micropropagação de Horticultura, do Instituto Superior de Agronomia, Engenheira Luísa e a D. Nídia.

A todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram, e contribuem, para que eu nunca desista dos meus sonhos e, principalmente, por acreditarem em mim.

Obrigada a todos vocês, que eu amo muito.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo insere-se no âmbito do Projeto Life No_Waste LIFE14 ENV/PT/000369 – “Management of biomass ash and organic waste in the recovery of degraded soils: a pilot project set in Portugal”, coordenado pela Universidade de Aveiro.



Este trabalho teve apoio financeiro, logístico e institucional do LEAF (Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem), suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (UID/AGR/04129/2013).



Resumo

Este trabalho visou analisar a utilização de indicadores de atividade microbiana na avaliação de ações de remediação de solos afetados por atividades mineiras (Faixa Piritosa Ibérica, FPI), recorrendo a resíduos da indústria da pasta e papel. O estudo foi realizado no âmbito do Projeto Life No_Waste, num Ensaio de Campo em São Domingos, utilizando solos de três minas da FPI (Aljustrel, Lousal e São Domingos) e diferentes corretivos: (i) grânulos de cinzas volantes da combustão de biomassa (GC), (ii) GC e lamas biológicas, do tratamento das águas residuais, compostadas (GC+LC), e (iii) uma mistura de cinzas e lamas tal e qual, sem estabilização prévia (C+L). Os solos originais foram utilizados como controlo. Os resultados mostraram uma melhoria nas características dos solos por aplicação dos materiais: aumento do pH, do teor de matéria orgânica, do teor em azoto Kjeldahl, P e K extraíveis, sem aumento significativo da condutividade elétrica, sendo que os melhores resultados foram obtidos por aplicação de GC+CL ou de C+L. A atividade microbiana nestes solos foi também avaliada recorrendo à quantificação preliminar das comunidades de bactérias e fungos, as quais foram determinadas através de técnica de plaqueamento em meios de culturas específicos. Fez-se também a extração do DNA destes microrganismos, de modo a amplificar os extratos de DNA, utilizando a técnica de PCR com *primers* específicos de cada grupo de organismos. Através do método de plaqueamento, observou-se uma maior carga de fungos do que de bactérias nos solos originais, tendência que se inverteu com a aplicação dos corretivos, com um aumento significativo do número de bactérias nos solos tratados com cinzas e lamas, estabilizadas e não estabilizadas. Foram testados três métodos de extração de DNA, tendo-se mostrado como mais eficiente para este tipo de amostras, solo poluído com alto teor de ácido húmico, o método de Kit DNeasy®PowerSoil®.

Palavra chave: Solos de minas; corretivos; atividade microbiana; extração de DNA; PCR (reação em cadeia de polimerase).

Abstract

This work aimed to analyze the use of microbial activity indicators in the evaluation of soil remediation actions of soils affected by mining activities (Iberian Pyrite Belt, FPI), using waste from the pulp and paper industry. The study was carried out under the Life No_Waste Project, in a Pilot Trial in São Domingos, using soils from three FPI mines (Aljustrel, Lousal and São Domingos) and different amendments: (i) granules of fly ash from biomass combustion (GC), (ii) GC and composted biological sludge from the wastewater treatment (GC + LC), and (iii) a mixture of ash and fresh sludge, without previous stabilization (C + L). The original soils were used as a control. The results showed an improvement in the characteristics of the soils by the application of the materials: increased pH, organic matter content, N Kjeldahl, P and K extractable content, without significant increase in electrical conductivity. The best results were obtained by application of GC + CL or C + L. The microbial activity in these soils was also evaluated using preliminary quantification of communities of bacteria and fungi, which were determined using the plating technique in specific culture media. The DNA was also extracted from these microorganisms, in order to amplify the DNA extracts, using the PCR technique with specific primers for each group of organisms. Through the plating method, a greater load of fungi than bacteria was observed in the original soils, a trend that was reversed with the application of the correctives, with a significant increase in the number of bacteria in soils treated with ashes and sludge, stabilized and not stabilized. Three methods of DNA extraction were tested, and the DNeasy®PowerSoil® Kit method evidenced to be the most efficient for this type of samples, polluted soil with a high humic acid content.

Keyword: Mine soils; soil amendments; microbial activity; DNA extraction; PCR (polumerase chain reaction).

Índice Geral

1- Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e objetivos	1
1.2 Estrutura da dissertação.....	6
2. Revisão bibliográfica	7
2.1 Degradação do solo por atividades mineiras – Faixa Piritosa Ibérica (FPI)	7
2.2. Remediação de solos degradados por atividades mineiras	9
2.2.1. Fitorremediação.....	10
2.2.2. Utilização de corretivos na melhoria da qualidade de solos de minas	13
2.3. Parâmetros de avaliação da qualidade do solo em estratégias de remediação de solos	16
2.3.1. Parâmetros físico-químicos	16
2.3.2. Teores em metais totais e biodisponíveis	18
2.3.3. Parâmetros biológicos	20
3. Material e Métodos	25
3.1. Caracterização dos solos e resíduos utilizados no Ensaio de Campo	25
3.2. Descrição do Ensaio de Campo	28
3.3. Metodologias utilizadas na caracterização físico-química dos solos.....	30
3.4. Metodologias de avaliação de atividade biológica.....	31
3.4.1. Atividade enzimática da desidrogenase	31
3.4.1. Avaliação molecular via amplificação por PCR com primers específicos para bactérias e fungos	32
3.4.2. Avaliação microbiológica por plaqueamento de fungos e bactérias.....	38

3.5..... Tratamento estatístico dos resultados	40
4. Resultados e discussão	41
4.1. Influência dos tratamentos nas características físico-químicas dos solos em estudo	41
4.1.1. Influência dos tratamentos no pH dos solos.....	41
4.1.2. Influência dos tratamentos na condutividade elétrica dos solos	42
4.1.3. Influência dos tratamentos nos teores de matéria orgânica dos solos.....	43
4.1.4. Influência dos tratamentos no teor de azoto Kjeldahl dos solos	44
4.1.5. Influência dos tratamentos nos teores de P e K extraíveis	45
4.2. Influência dos tratamentos nos teores de metais extraíveis dos solos.....	47
4.3. Influência dos tratamentos nas atividades microbianas dos solos	48
4.3.1. Influência dos tratamentos na atividade enzimática da desidrogenase	48
4.3.2. Avaliação da presença de microrganismos no solo por PCR com primers específicos para fungos e bactérias.....	49
4.3.3. Influência dos tratamentos no crescimento dos microrganismos do solo (bactérias e fungos) - Plaqueamento com contagem de colónias	54
4.4. Relação entre os resultados para os parâmetros físico-químicos, os teores em metais extraíveis e as atividades microbianas.....	57
5. Conclusão	58
6. Referências bibliográficas	60
6.1. Bibliografia Eletrónica.....	68
7. Anexos	69
7.1. Anexo A: Protocolo de Extração de DNA - Kit DNeasy®PowerSoil®	69

7.2. Anexo B – Imagem do espectrofotómetro com as curvas de absorvância de 230 a 320 nm, dos extratos das amostras de solos das minas de Aljustrel.....	70
7.3. Anexo B – Imagem do espectrofotómetro com as curvas de absorvância de 230 a 320 nm, dos extratos das amostras de solos das minas de Lousal.....	72
7.4. Anexo B – Imagem do espectrofotómetro com as curvas de absorvância de 230 a 320 nm, dos extratos das amostras de solos das minas de São Domingos.	74

Índice de figuras

Figura 1 - Jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos no sector português da Faixa Piritosa Ibérica (Adaptado de: Simões, 2012). Apresentam-se assinaladas as três minas cujos solos foram utilizados neste estudo: Aljustrel, Lousal e São Domingos.....	8
Figura 3.1 - Grânulos de cinzas de biomassa	27
Figura 3.2 - Lamas celulósicas compostadas com resíduos vegetais (Fonte: https://www.lifenowaste.pt/s/).....	28
Figura 3.3 - Representação esquemática dos talhões do Ensaio de Campo montado na Mina de São Domingos, quatro talhões com os solos de cada uma das minas, com os respetivos tratamentos (https://www.lifenowaste.pt/s/). As letras A, L e SD, corresponde os iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L), respetivamente. 0 - amostras de solos das minas utilizadas como controlo	29
Figura 3.4 - Vista dos talhões do Ensaio de Campo na Mina de São Domingos (quatro talhões com os solos de cada uma das minas, com os respetivos tratamentos)	30
Figura 3.5 - Extração do DNA, pelo método do Kit DNeasy®PowerSoil®	33
Figura 3.6 - Gráficos das leituras das absorvância com a sua repectiva curva de absorvância, em análise espectrofotométrica.....	35
Figura 2.7 - Termociclador para amplificação do PCR	34
Figura 3.8 - Eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) do produto de PCR.	37
Figura 4.1 - Valores de pH nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, p>0,05). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.....	42

Figura 4.2 - Valores de CE nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.....43

Figura 4.3 - Valores de MO nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.....44

Figura 4.4 - Valores de N_{KJ} nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.....45

Figura 4.5 - Teores de fósforo extraíveis ($P_{extraível}$), nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.....46

Figura 4.6 - Valores de potássio extraíveis ($K_{extr.}$) nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.....49

Figura 4.7 - Placas com as colónias de bactérias, 100µl de extratos de solos.....55

Figura 4.8 - Placas com as colónias de bactérias, 10µl de extratos de solos	55
Figura 4.9 - Placas com as colónias fúngicas, 100 µl de extratos de solos.....	57
Figura 5 - Placas com as colónias fúngicas, 10 µl de extratos de solos	57
Figura 6 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato de DNA, da amostra de solo das minas de Aljustrel, corrigidas com GC+ LC.....	51
Figura 7 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato de DNA, da amostra de solo das minas de Lousal, corrigidas com GC+LC.....	51
Figura 8 - Perfil de amplificação dos extratos de DNA usando os primers de bactérias (B2TF e V1492R), separados em gel agarose de 2%. As letras A, L e SD, corresponde os iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L), respetivamente. 0 - amostras de solos das minas utilizadas como controlo; M-Marcador 100 pb Ladder Plus.....	52
Figura 9 - Perfil de amplificação dos extratos de DNA usando os primers de fungos (ITS1F e ITS4R), separados em gel agarose de 2%. As letras A, L e SD, corresponde os iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L), respetivamente. 0 - amostras de solos das minas utilizadas como controlo; M-Marcador 100 pb Ladder Plus.....	53

Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Características físico-químicas gerais dos solos utilizados nos ensaios de campo e, comparação dos teores de metais totais com valores de referência (média, n=3). Fonte: Projeto LIFE No_Waste).....	26
Tabela 3.2 - Composição dos materiais aplicados aos solos (média \pm desvio-padrão, n=3). Resultados reportados à matéria seca (ms)	27
Tabela 3.3 - Composto da reação do PCR, respetivos volumes a adicionar à mistura, mix, para as 12 amostras.....	36
Tabela 4.1 - Teores de metais extraíveis com CaCl_2 0,01 M nos solos de cada um dos talhões do Ensaio de Campo, nos três tempos de amostragem (média, n = 3). Resultados reportados à matéria seca.....	47
Tabela 4.2 - Atividade enzimática da desidrogenase, nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem (valores na matéria seca, média, n=3).....	49
Tabela 4.3 - Valores das Razões de absorvância para a quantificação de ácido húmico, DNA e proteína, por espectrofotómetro.....	50
Tabela 4.4 - Contagem de número de colónias de bactérias.....	54
Tabela 4.5 - Contagem de número de colónias fungos.....	56

Siglas e Abreviaturas

FPI	Faixa Piritosa Ibérica
MO	Matéria Orgânica
CTC	Capacidade de Troca Catiónica
L	Lamas Biológicas
LC	Lama Compostada
C	Cinzas de Biomassa
GC	Cinzas de Biomassa Granuladas
APA	Agência Portuguesa do Ambiente, I.P.
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GEE	Gases com Efeito de Estufa
LER	Lista Europeia de Resíduos
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
P _{ext.}	Fósforo extraível
K _{ext.}	Potássio extraível
CE	Condutividade elétrica
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amónio
TPF	Trifenilformazan
TTC	Trifeniltetrozónio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
NaCl	Cloreto de sódio

1- Introdução

1.1 Enquadramento e objetivos

O rápido crescimento populacional e industrial, acompanhado por um aumento da exploração de recursos, tem contribuído para a ampliação da poluição nos diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar). Os recursos do solo, em particular, têm sido excessivamente explorados, degradados e irreversivelmente perdidos devido às más práticas do uso da terra e das atividades industriais (FAO e ITPS, 2015).

Os impactes ambientais resultantes das atividades humanas provocam degradação dos solos, reduzindo assim a sua capacidade em suportar estas atividades, apresentando efeitos adversos, como por exemplo, a erosão, compactação, impermeabilização, contaminação química, perda de biomassa, nutrientes, matéria orgânica e, também, a perda da biodiversidade. De acordo com um relatório da Organização das Nações Unidas (ONU), devido a fenómenos como a erosão do solo, esgotamento de nutrientes, impermeabilização, perda de carbono orgânico, tem-se verificado uma rápida diminuição da qualidade do solo a nível mundial. O relatório demonstra ainda que é possível evitar essas perdas do recurso do solo, e suas funções, adotando ações que priorizem uma gestão mais sustentável do solo (FAO e ITPS, 2015).

Um dos problemas associados à perda de qualidade do solo é a sua contaminação. A maior parte da contaminação local dos solos está associada à gestão e deposição de resíduos (37,1% das situações), atividades industriais e comerciais intensivas (33,2%), armazenamento, derrames durante o transporte de materiais, atividade militares ou nucleares, entre outras atividades antropogénicas (Panagos et al., 2013). A gestão desses locais contaminados é um processo que deve começar pela identificação dos locais potencialmente contaminados, conhecer a extensão real da contaminação e seus impactes ambientais e, por fim, culminar na implementação de medidas de remediação e de monitorização.

Uma das atividades que muito contribui para a contaminação de solos é a atividade de extração de minério. Este setor contribui com cerca de 6,2% da contaminação gerada em atividades industriais, sendo os metais potencialmente tóxicos o grupo de contaminantes disseminado no ambiente por esta atividade humana. Para além disso, este é o grupo de contaminantes mais relevante entre todos os grupos de contaminantes que afetam os solos, sendo responsável por 34,9% dos solos contaminados, só a nível Europeu (Panagos et al., 2013).

De facto, a exploração mineira contribui para o desenvolvimento socioeconómico do país, apresentando, porém, impacte significativo na qualidade ambiental e na saúde pública. Durante grande parte dos séculos XIX e XX, a exploração mineira na Faixa Piritosa Ibérica (FPI) foi uma atividade relevante para o desenvolvimento socioeconómico da região Sul de Portugal, no entanto foi também uma atividade que muito contribuiu para a degradação e contaminação desses solos. Após terem sido exploradas intensivamente, a maioria das minas da FPI foram abandonadas, sem terem sido implementadas medidas estratégicas para minimizar os impactes ambientais decorrentes da sua exploração, tendo nelas depositadas uma grande variedade de escomboreiras com características e potencial contaminante distintos. À exceção da Mina de Neves Corvo, todas as explorações do sector português da FPI, nomeadamente São Domingos, Aljustrel, Lousal e Caveira, apresentam impactes ambientais significativos, sobretudo ao nível da rede hidrográfica, afetada pela drenagem não controlada de efluentes ácidos gerados nas referidas escomboreiras. Tanto as minas superficiais como as minas sub-superficiais, apresentam riscos para a saúde humana. Os potenciais riscos para a saúde humana ocorrem praticamente em todo o ciclo de vida da mineração, desde a exploração até o encerramento e/ou abandono das minas, mas, especialmente, nesta última fase (Matos e Martins, 2006; Abreu et al., 2009).

A maioria dos solos das áreas mineiras são solos com uma estrutura física desfavorável à retenção e circulação de água, elevada acidez, deficiências nutricionais, baixo teor em matéria orgânica (MO), baixa capacidade de troca catiónica (CTC), e concentrações elevadas em elementos potencialmente tóxicos (metais e/ou metaloides) (Matos e Martins, 2006; Abreu et al., 2009; Alvarenga et al., 2004; 2008a; 2009a). Por tudo isto, apresentam uma cobertura vegetal escassa e uma reduzida atividade microbiana (Alvarenga et al., 2004; 2009b).

É necessário remediar estas áreas afetadas por atividades mineiras e existem diversas medidas estratégicas que pode promover a reabilitação dos seus solos (Alvarenga et al., 2011). Estas estratégias podem passar pela (i) escavação, remoção do solo contaminado e confinamento em aterro, (ii) pela extração dos contaminantes da massa de solo contaminado, por aplicação de um tratamento *in situ* ou *ex situ*, ou (iii) pela recuperação dos solos contaminados até um nível de funcionalidade que se considere aceitável, por estabilização dos contaminantes, o que diminui o risco para o ambiente e para a saúde humana. A solução adotada deve considerar os custos associados, sendo que é importante que se utilizem tecnologias de baixo custo para recuperação de áreas mineiras degradadas, e que sejam sociais, económica e ambientalmente sustentáveis.

Normalmente, as tecnologias que obedecem a este conjunto de condições são as que se aplicam *in situ*, sem escavação do solo a tratar, uma vez que reduzem bastante os custos e o impacto ambiental associado à sua implementação (Alvarenga et al., 2008a; 2009a; 2009b; Rodrigues, 2017).

Considerando as diferentes técnicas e processos já utilizados para a remediação *in situ* de solos contaminados por este tipo de atividade, a fitorremediação é apresentada como a escolha mais adequada, visto que é uma técnica auto-sustentável, de baixo custo, e que permite recuperar áreas extensas, imobilizando os contaminantes e possibilitando o revestimento do solo com um coberto vegetal. A estratégia específica da fitorremediação de solos mais adaptada a esta situação é a fitoestabilização, a qual consiste na conjugação da imobilização *in situ* dos metais, por incorporação de corretivos orgânicos e/ou inorgânicos, e subsequente revegetação desses solos. Esta é considerada uma estratégia realista, economicamente viável e ambientalmente sustentável, especialmente quando as áreas afetadas são extensas e o nível de contaminação por metais elevado, uma vez que os solos podem ser corrigidos com recurso aos resíduos produzidos noutras atividades indústrias, ou no tratamento de águas e resíduos, numa perspetiva de economia circular (Alvarenga et al., 2008a; 2009a; 2009b; Rodrigues, 2017).

Como foi referido, os resíduos que podem ser aplicados ao solo devem permitir a correção da sua acidez, o que permitirá uma potencial imobilização dos metais potencialmente tóxicos que os contaminam, mas também o fornecimento de matéria orgânica e nutrientes. Vários têm sido os resíduos, orgânicos e inorgânicos, testados por diferentes autores, como sejam lamas residuais urbanas, composto da fração orgânica de diferentes tipos de resíduos, estrumes e chorumes animais, para além de diferentes tipos de cinzas e outros corretivos minerais alcalinizantes (Alvarenga et al., 2008a; 2008a; 2009b; Rodrigues, 2017).

Os resíduos produzidos na indústria da pasta de papel, nomeadamente lamas do tratamento biológico das águas residuais e cinzas de queima de biomassa vegetal, apresentam uma composição adequada à sua utilização na remediação de solos ácidos, devido ao elevado teor em matéria orgânica existente nas lamas e às características alcalinas e elevada concentração em alguns nutrientes presentes nas cinzas (Cruz et al., 2017; Rodrigues, 2017; Alvarenga et al., 2019). A valorização destes resíduos na remediação de solos degradados por atividades mineiras constitui uma alternativa à sua deposição em aterro, uma estratégia importante no paradigma da economia circular que se pretende adotar a nível Europeu (European Commission, 2008). Porém, ambos os

materiais possuem uma formulação pouco adequada à sua aplicação “tal e qual” ao solo: as características pulverulentas das cinzas dificultam o seu transporte e aplicação nos solos, uma vez que se dispersam muito, enquanto que as lamas residuais, devido à sua elevada putrescibilidade e elevado teor em humidade, necessitam de uma estabilização e desidratação adequadas. Nesse sentido, foi estudado o processo de co-granulação desses materiais, tendo sido já avaliado o efeito da aplicação desses grânulos de cinza e lamas biológicas a solos da mina de Aljustrel, em ensaios em vaso (Rodrigues, 2017; Alvarenga et al., 2019). Nesse estudo, foi evidenciada a capacidade dos grânulos para melhorarem a qualidade do solo, pela correção da sua acidez, pelo aumento dos teores em P e K extraíveis, diminuição do teor em metais extraíveis, e pelo aumento da atividade enzimática da desidrogenase. Porém, o aumento significativo dos teores em matéria orgânica e em N só foi possível por aplicação simultânea de grânulos com composto de resíduos sólidos urbanos (RSU) (Rodrigues, 2017; Alvarenga et al., 2019). Foi também observado um indesejável efeito fitotóxico sobre a planta utilizada no ensaio, *Agrostis tenuis*, o qual foi atribuído ao stress salino provocado pelo aumento da condutividade elétrica no solo, pela aplicação dos grânulos de cinzas + lamas, ou aos efeitos de toxicidade iónica específica dos iões cloreto ou sódio, cujas concentrações extraíveis por água também aumentaram consideravelmente (Alvarenga et al., 2019).

O presente estudo está enquadrado nesta temática, e foi realizado no âmbito do projeto LIFE No_Waste, coordenado pela Universidade de Aveiro, tendo sido acompanhado um Ensaio de Campo a decorrer em São Domingos, em que se pretende avaliar a possibilidade da utilização de cinzas de biomassa e lamas biológicas, ambos os resíduos produzidos numa indústria Portuguesa de pasta de papel, na correção de solos degradados por atividades mineiras, com origem em três das minas da FPI (Aljustrel, Lousal e São Domingos). Tendo em consideração os resultados previamente obtidos, os resíduos utilizados na correção dos solos no Ensaio de Campo foram: (i) uma mistura de cinzas volantes da queima de biomassa vegetal e lamas biológicas da estação de tratamento de água residual dessa indústria, “tal e qual” são recolhidas na indústria de pasta de papel e papel; (ii) grânulos de cinzas de biomassa, estabilizados durante seis meses “ao ar”; e (iii) lamas biológicas obtidas por compostagem com resíduos de biomassa vegetal como agente estruturante.

No estudo apresentado nesta Tese, em particular, pretende-se evidenciar a importância da utilização de indicadores da atividade microbiológica na avaliação das ações de remediação dos solos utilizadas no Ensaio de Campo.

Neste contexto, o trabalho a desenvolver na tese, pretende alcançar os seguintes objetivos:

Objetivo geral: Estudar a utilização de indicadores físico-químicos, bioquímicos e biológicos na avaliação da eficácia da utilização de cinzas de biomassa e lamas biológicas da indústria da pasta de papel e papel, em ações de remediação de solos degradados por atividades mineiras.

Objetivos específicos:

- Utilizar propriedades físico-químicas (e.g., pH, condutividade elétrica, teor de matéria orgânica, N Kjeldahl, P e K extraíveis) e indicadores da contaminação dos solos (e.g., teores de metais extraíveis) para analisar a eficácia da utilização de resíduos da indústria da pasta de papel e papel, em diferentes formulações, na melhoria da qualidade físico-química de solos afetados por atividades mineiras.
- Utilizar indicadores de atividade microbiológica, como sejam, atividade da desidrogenase e quantificação da carga microbiológica dos solos (bactérias e fungos), utilizando os processos de plaqueamento (contagem de colónias) e amplificação por PCR (reação em cadeia de polimerase) na avaliação dessas ações de remediação dos solos;
- Comparar os resultados obtidos pelos diferentes indicadores, relacionando-os com a eficácia dos tratamentos utilizados na remediação dos solos.

A preparação do Ensaio de Campo em São Domingos foi da responsabilidade da EDM (Empresa de Desenvolvimento Mineiro), com materiais preparados pela Universidade de Aveiro (CESAMB), sob coordenação da Doutora Sónia Rodrigues, investigadora responsável pelo projeto LIFE No_Waste. Os resultados dos teores de metais totais e extraíveis foram obtidos pela equipa da Universidade de Aveiro. Os resultados das análises físico-químicas e das atividades enzimáticas dos solos foram obtidos no âmbito do projeto LIFE No_Waste no Departamento de Tecnologias e Ciências Aplicadas, da Escola Superior Agrária, do Instituto Politécnico de Beja, sob coordenação da Professora Patrícia Palma.

Os trabalhos conducentes à obtenção dos resultados dos indicadores de atividade microbiológica (quantificação da carga microbiológica dos solos, por plaqueamento e amplificação por PCR), foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular e Micropropagação de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia, sob orientação da Professora Doutora Mariana Mota.

1.2 Estrutura da dissertação

O estudo que aqui se desenvolve baseia-se na problemática da avaliação da eficácia da reabilitação ambiental de solos degradados por atividades mineiras, utilizando indicadores microbiológicos, sendo a dissertação subdividida nos seguintes capítulos:

Capítulo 1. Introdução: onde se engloba o enquadramento da problemática da contaminação dos solos, com a descrição dos objetivos deste trabalho.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica: onde se procede à descrição da situação atual da exploração mineira na Faixa Piritosa Ibérica (FPI), se referem os impactes causados por este tipo de atividade, se abordam as principais técnicas utilizadas na remediação destes solos, assim como os principais parâmetros utilizados na avaliação da sua qualidade, cujos resultados permitem efetuar a avaliação e otimização de processos da remediação de solos de minas abandonadas, detalhando os indicadores de atividade microbiológica.

Capítulo 3. Material e métodos: onde se faz uma breve caracterização do local de estudo, se descrevem os materiais utilizados no Ensaio de Campo (solos e resíduos da indústria da pasta de papel e papel), se descreve o Ensaio de Campo que foi montado, e se descrevem as metodologias utilizadas na avaliação da qualidade dos solos, com especial ênfase para as metodologias desenvolvidas neste estudo (indicadores de atividade microbiológica, quantificação da carga microbiológica dos solos, por plaqueamento e amplificação por PCR).

Capítulo 4. Resultados e discussão: onde se procede à apresentação e discussão dos resultados obtidos no Ensaio de Campo para os parâmetros físico-químicos, teor em metais extraíveis e atividade enzimática da desidrogenase nos solos corrigidos, em três momentos distintos do ensaio (T1, T2 e T3), e se apresentam os resultados obtidos para os indicadores de atividade microbiológica em T3 (quantificação da carga microbiológica dos solos, por plaqueamento e amplificação por PCR), relacionando os resultados obtidos entre os vários parâmetros utilizados.

Capítulo 5. Conclusão: neste capítulo são apresentadas as considerações finais deste estudo, realçando as principais conclusões.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Degradação do solo por atividades mineiras – Faixa Piritosa Ibérica (FPI)

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI), ocupa uma vasta área na região Sudoeste da Península Ibérica, estendendo-se por uma faixa de, aproximadamente, 250 km de comprimento por 35 km de largura, que se estende desde Sevilha (Espanha) até às proximidades de Grândola (Portugal) (Oliveira et al., 2002) (Figura 1). Com cerca de cinco mil anos de atividade extrativa, é considerada uma das maiores regiões mineiras europeias pelo elevado número de jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos (cerca de 90 jazigos de pirite), o que lhe confere um estatuto de província metalogenética de classe mundial, na qual merece destaque a Mina de Neves-Corvo pelos seus elevados teores em cobre (Cu), zinco (Zn) e estanho (Sn) (Martins e Carvalho, 2007). Após a intensa atividade extrativa que decorreu desde o século XIX até meados do século XX, a maioria das minas da FPI foram encerradas sem qualquer tipo de planeamento ou implementação de programas de minimização dos impactos ambientais (Oliveira, 1997).

Como resultado deste tipo de exploração, existem na área diferentes tipos de escombreliras, algumas de grande volume e extensão, com elevadas concentrações de metais (Cu, Cd, Mn, Zn, Pb, Ni) e metaloides (As, Se), pH ácido, baixo teor em matéria orgânica e noutros nutrientes essenciais. A continuada oxidação dos sulfuretos existentes em algumas destas escombreliras, e consequente geração de efluentes mineiros de drenagem ácida, representa um risco acrescido pela potencial dissolução de fases sólidas e libertação de elementos químicos potencialmente tóxicos, que podem levar à contaminação de águas, sedimentos e solos (Alvarenga et al., 2014). No solo, a mobilidade e disponibilidade dos elementos químicos é controlada pelas suas características físicas, químicas, mineralógicas e biológicas aí existentes, influenciando o risco ambiental e de saúde pública (Santos, 2011). Por este motivo, os solos nas imediações das explorações mineiras poderão conter teores anormalmente elevados de elementos potencialmente tóxicos, carecendo de uma intervenção que permita a sua remediação.

No caso da FPI, como se tratam de sulfuretos maciços polimetálicos, os elementos que mais habitualmente aparecem como contaminantes são o Cu, Pb, Zn, As, Fe, Sb e Sn, sendo também habitual o aparecimento de solos em que a acidez é considerável (pH < 4) devido à existência de escombreliras (Matos e Martins, 2006a). As escombreliras constituem efetivamente a maior fonte de contaminação por ainda conterem quantidades apreciáveis de metais (Oliveira et al., 2002). Os problemas ambientais provocados pelas escombreliras existentes devem-se, por um lado, à facilidade com que

podem ser erodidas e lixiviadas e, por outro, aos mecanismos de dispersão dos seus materiais que, desta forma, podem depositar-se na envolvente mais ou menos próxima, afetando os sistemas ambientais em geral, e os solos em particular (Matos e Martins, 2006a). O impacto no solo, resultante de operações mineiras, reflete-se essencialmente na sua contaminação e na perda da qualidade de solo em termos da sua capacidade para a sustentação de vida – função habitat. A acidificação do solo bem como a sua contaminação por metais, resultante da circulação de águas ácidas ou da deposição de poeiras contendo sulfuretos, são os aspetos mais preocupantes e aqueles que mais se podem agravar com o abandono da exploração mineira (Matos et al., 2008b).

Os solos muito poluídos por metais, principalmente, os que se encontram na proximidade da mina, apresentam-se na sua maioria desprovidos de vegetação devido aos efeitos tóxicos dos metais. Os solos estéreis são facilmente erodidos, levando a uma rápida dispersão dos poluentes na área circundante, por lixiviação das águas da chuva ou por intermédio do vento, aumentando a cada dia o raio de ação do agente de poluição (Alvarenga, 2004).

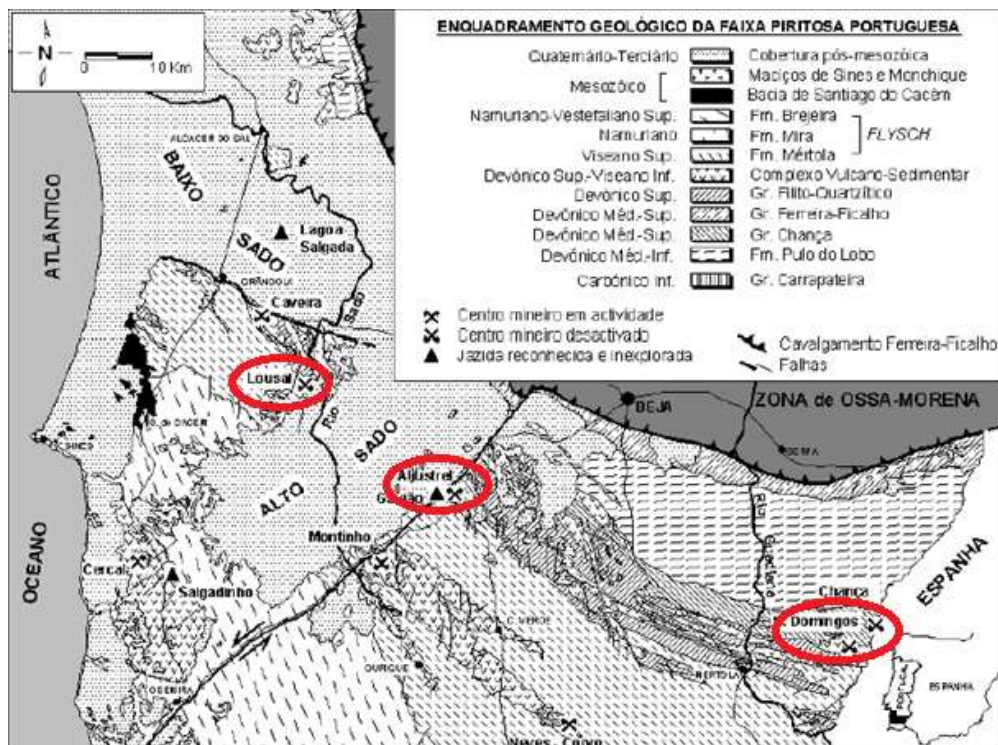


Figura 1. Jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos no sector português da Faixa Piritosa Ibérica (Adaptado de: Simões, 2012). Apresentam-se assinaladas as três minas cujos solos foram utilizados neste estudo: Aljustrel, Lousal e São Domingos.

Do ponto de vista ambiental, os riscos associados a uma atividade de exploração mineira aumentam gradualmente com o passar dos anos, após o seu abandono. O

encerramento desta atividade sem a devida precaução, promove o agravamento desses impactos ambientais, sobretudo quando não são implementadas medidas estratégicas de isolamento das escórias e de impermeabilidade dos locais de deposição (Mateus, 2008, citado por Rodrigues, 2017)

As explorações do sector Português da Faixa Piritosa Ibérica (FPI), com exceção da Mina de Neves Corvo, apresentam impactes significativos, principalmente a nível dos sistemas hidrográfico, necessitando de medidas específicas de remediação (Matos e Martins, 2006).

2.2. Remediação de solos degradados por atividades mineiras

Existem diferentes estratégias para a remediação de solos afetados por atividades mineiras. A opção convencional, que pode ser classificada como uma técnica construtiva, consiste na escavação e remoção do solo contaminado, fazendo a sua substituição por solo de cobertura não contaminado. Embora seja uma das soluções mais utilizadas, não é sustentável, nem económica nem ambientalmente, quando as áreas afetadas são muito extensas (Alvarenga, 2009). São técnicas facilmente aplicáveis, mas que apresentam algumas limitações, visto que são técnicas com elevado impacto ambiental, sobretudo no local da escavação. Apesar de ser uma técnica muito eficaz em remover os contaminantes do local afetado, esta não elimina e nem reduz o grau da perigosidade dos contaminantes (Ferreira, 2016).

A outra opção consiste na utilização de técnicas processuais, em que os solos, e os seus contaminantes são alvo de tratamento, de modo a destruir o contaminante no solo, extraí-lo do solo, ou estabilizá-lo no solo. Podem ser tratamentos *in situ*, em que o solo é tratado no local sem necessidade de escavação da massa de solos a tratar, ou *ex situ*, em que o solo contaminado é escavado e tratado numa área adjacente ao local contaminado (*on site*), ou removido e levado para uma estação de tratamento (*off site*). Neste caso, estas técnicas são designadas como técnicas processuais, em oposição às técnicas construtivas, uma vez que utilizam processos físicos, químicos ou biológicos para remover, destruir e/ou modificar os contaminantes. Estas técnicas são, normalmente, classificadas de acordo as tecnologias utilizadas em: tratamentos químicos, tratamentos físicos, tratamentos biológicos, tratamentos térmicos e a solidificação/estabilização dos solos (Alvarenga, 2009). No caso de solos afetados por atividades mineiras, em que os contaminantes são predominantemente metais, os tratamentos a utilizar poderão ser a eletrorremediação, a lavagem de solos (ambos

tratamentos físicos), a solidificação/estabilização, ou a fitorremediação (tratamento biológico). Algumas destas alternativas, como os tratamentos físicos, são postas de parte nestas situações de contaminação em que as áreas afetadas são muito vastas, e em que os solos possuem um interesse socioeconómico reduzido, uma vez que são mais dispendiosas do que as outras soluções (Alvarenga, 2009).

Nos últimos anos, tem sido explorada a possibilidade da redução do risco nas áreas contaminadas, controlando a exposição aos contaminantes, utilizando técnicas de estabilização *in situ* por aplicação de corretivos aos solos, seguidas da revegetação dos solos, ou seja, fazendo a sua fitoestabilização. A fitoestabilização assistida, que consiste na conjugação da imobilização *in situ* dos metais, por incorporação de corretivos orgânicos e/ou inorgânicos, e subsequente revegetação desses solos, enquadra-se neste último grupo de técnicas, sendo considerada uma estratégia realista, “amiga” do ambiente e economicamente viável, especialmente para vastas áreas industriais, como áreas mineiras abandonadas, (Alvarenga et al., 2009a; Alvarenga et al., 2009b; Alvarenga et al., 2011).

No estudo abordado nesta dissertação, foi esta a solução avaliada na correção dos solos afetados por atividades mineiras, sendo por isso mais desenvolvida esta temática, seguidamente.

2.2.1. Fitorremediação

Alguns processos de descontaminação de solos são classificados como biológicos, como é o caso da biorremediação e a fitorremediação, uma vez que utilizam os processos metabólicos naturais de organismos vivos para a transformação, extração ou estabilização dos contaminantes nos solos. A biorremediação baseia-se no uso de microrganismos com capacidade de transformar substâncias tóxicas, normalmente moléculas orgânicas, noutras menos tóxicas, podendo ser aplicada *in situ* ou *ex situ*. A biorremediação não é uma técnica indicada para tratamento de solos contaminados por contaminantes inorgânicos, como metais, visto que estes contaminantes podem ser tóxicos para os microrganismos e, também, pelo facto de a biomassa microbiana quando fechar o seu ciclo de vida, continua a fazer parte da matriz do solo (Alvarenga, 2009; Bui et al., 2019).

A fitorremediação engloba todos os processos envolvidos na remediação de solos, sedimentos e aquíferos contaminados utilizando plantas. Tecnicamente é definida como

sendo o uso de plantas e seus microrganismos para remover, conter, transferir, estabilizar e/ou degradar, os contaminantes, incluindo compostos orgânicos e metais tóxicos (Pilon-Smits, 2005; Silva, 2012). Contrariamente à biorremediação, a fitorremediação compreende um grupo de técnicas de tratamento de solos (fitotecnologias) adequadas a tratamento de solos contaminados com metais, sendo mais barata e ecologicamente mais sustentável do que os tratamentos físicos e/ou químicos. Com base no seu processo de reação com os metais no solo e na água, a fitorremediação é classificada em cinco tipos distintos: fitoestabilização, fitoestimulação, fitotransformação, rizofiltração e filtroextração (Pilon-Smits, 2005). De entre estas, a fitoextração e a fitoestabilização poderiam teoricamente ser consideradas na situação de solos de minas.

A fitoextração consiste na extração de contaminantes metálicos a partir do solo e na sua acumulação em partes da planta que se possam colher, incluindo raízes e folhas. Nesta técnica, uma planta acumuladora de metais, ou uma combinação delas, selecionada(s) de acordo com o tipo de metais existentes na zona a descontaminar, bem como noutras características do local, é utilizada para efetuar o coberto vegetal desse local. Depois das plantas terem sido deixadas crescer durante semanas ou meses, são colhidas e tratadas como material contaminado. Este processo pode ser repetido sequencialmente (durante meses ou anos) até fazer baixar a contaminação no solo abaixo dos limites permitidos por lei ou ambientalmente aceitáveis (Alvarenga, 2009). O principal objetivo da fitoextração é reduzir a concentração de metais em solos contaminados dentro de um período razoável. O processo de extração depende da capacidade que as plantas selecionadas têm de crescer e acumular metais sob condições específicas de clima e solo do local que está a ser tratado (Silva, 2012). A planta ideal para um processo de fitoextração deve não só tolerar e acumular teores elevados de metais tóxicos nos órgãos que possam ser colhidos (principalmente folhas), como também possuir uma rápida taxa de crescimento e a capacidade de produzir um elevado rendimento em biomassa. Idealmente, deveriam ser plantas hiperacumuladoras. Algumas plantas, classificadas como acumuladoras ou hiperacumuladoras, possuem a capacidade de armazenar elevadas quantidades de alguns metais nos seus tecidos, inclusive metais que não são, aparentemente, utilizados nas funções celulares dessa planta (Alvarenga, 2009). Depois das plantas terem acumulado os contaminantes, as folhas podem ser colhidas e as raízes removidas, estando a eliminação ou o subsequente processamento do material dependente da toxicidade dos produtos finais. Os fatores que afetam o processo da fitoextração, ou seja, os fatores que influenciam e/ou limitam a eficiência da planta na acumulação de metais pesados, estão diretamente associados com a

combinação entre as características das plantas e as condições ambientais do meio. Tais fatores, como por exemplo, o sistema radicular superficial da planta, a taxa de crescimento lento e, conseqüentemente, a baixa produção de biomassa, podem limitar o processo de fitoextração (Bui et al., 2019). A fitoextração é, por isso, uma excelente técnica para eliminar os metais do meio ambiente, mas que se adequa mais para os locais onde as suas concentrações são baixas, não sendo, por isso, a estratégia mais adequada a solos afetados por explorações mineiras, em que as concentrações de metais são muito elevadas.

Por outro lado, a fitoestabilização consiste na utilização de plantas para proteger o solo contaminado da erosão eólica e hídrica, imobilizando os contaminantes no solo, por formação de compostos de baixa solubilidade na zona da raiz, adsorção à raiz, ou absorção e acumulação na raiz, reduzindo a mobilidade daqueles e prevenindo a migração para águas subterrâneas (lixiviação), ou a entrada na cadeia alimentar. Uma planta adequada a um processo de fitoestabilização é aquela que, para além de tolerar concentrações elevadas de metais tóxicos no solo (metalófitas), é capaz de excluir esses metais da parte aérea, restringindo-os aos tecidos radiculares, promovendo a sua precipitação e/ou redução na zona da raiz. Isto porque se as plantas acumularem concentrações excessivas de elementos tóxicos no material vegetal que pode ser consumido pelos animais, constituem um risco de contaminação da cadeia alimentar humana (Alvarenga et al., 2011). Pelo exposto, a fitoestabilização é a fitotecnologia mais adequada à remediação de solos afetados por atividades mineiras, tendo sido a solução avaliada neste estudo.

Como se disse, no processo da fitoestabilização, a escolha da planta deve ser baseada na capacidade de a planta tolerar altas concentração de metais e de os excluir da parte aérea, reduzindo assim o risco da transferência dos metais para a cadeia alimentar humana (Bui et al., 2019). Porém, podem ser escolhidas plantas com um sistema radicular extenso, para que a eficácia na imobilização de metais seja maior. Para estabelecer uma cobertura vegetal a longo prazo em solos degradados por atividades mineiras, corrigidos com materiais à base de cinza de biomassa, como é o caso deste estudo, recomenda-se a seleção de plantas com maior tolerância à salinidade ou com capacidades de reduzir o teor de sal solúvel (Alvarenga et al., 2019).

Para que qualquer estratégia de fitorremediação, nomeadamente a fitoestabilização, possa ser aplicada num determinado tipo de solo, principalmente em solos de minas, na maioria das vezes é necessário proceder à correção do solo, devido a problemas como: (I) pH muito baixo, (II) insuficiência de MO e de elementos essenciais para o ciclo

vegetativo, (III) presença de elementos potencialmente tóxicos (metaloides e/ou metais) em concentrações elevadas e com elevada mobilidade e disponibilidade, e (IV) déficit na estrutura do solo, que o torna mais compactado, menos flexível à penetração das raízes, menos permeável e com pouca capacidade de retenção de água (Alvarenga et al., 2009a; 2009b). Por tudo isto, os solos das minas, onde se preconiza o seu tratamento por fitoestabilização necessitam de ser melhorados nas suas propriedades físico-químicas, o que pode ser conseguido pela sua correção orgânica e/ou inorgânica.

2.2.2. Utilização de corretivos na melhoria da qualidade de solos de minas

Os corretivos são substâncias que atuam de forma essencialmente indireta na melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos. Quanto à origem podem ser classificados em orgânicos (de origem animal, vegetal ou ambas) ou minerais (Santos, 2015).

Em relação aos efeitos, estes são divididos em alcalinizantes, acidificantes ou condicionadores. Os corretivos alcalinizantes ou acidificantes são produtos minerais utilizados para corrigir o pH dos solos, para o elevar ou diminuir, respetivamente, enquanto os condicionadores são produtos utilizados para modificar as propriedades físico-químicas dos solos, as quais, de um modo geral, condicionam a sua fertilidade de uma maneira indireta. Os corretivos orgânicos têm por finalidade aumentar, ou pelo menos manter, o teor de matéria orgânica dos solos nos quais são aplicados. Exemplos de corretivos orgânicos habitualmente utilizados são os estrumes e chorumes animais, as lamas resultantes do tratamento das águas residuais, composto de resíduos orgânicos, turfa, algas e restos das culturas (Santos, 2015).

No caso dos solos degradados por atividades mineiras há interesse em corrigir a sua acidez, devendo, por isso, ser aplicados corretivos minerais alcalinizantes, mas, também, aumentar o seu teor em matéria orgânica, que provocará uma melhoria global da sua fertilidade. Com a adição dos corretivos alcalinizantes, é possível o aumento do pH do solo pela neutralização do ião hidrónio (H_3O^+). Esta correção alcalina pode ser atingida pela aplicação de produtos como sejam o carbonato de cálcio ($CaCO_3$), hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), ou mesmo o óxido de cálcio (CaO) (Santos, 2015).

Nas estratégias de remediação de solos de minas, é aconselhada a utilização de resíduos obtidos em outras atividades humanas na correção dos solos, promovendo assim a sua valorização e evitando a sua eliminação em aterros. Os resíduos orgânicos

podem melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos, pois permitem não só aumentar o teor de MO e de nutrientes essenciais para as plantas, como também corrigir o seu pH, reduzindo a biodisponibilidade dos metais, e aumentando a sua capacidade de retenção da água (Alvarenga et al., 2011). Têm sido vários os tipos de resíduos orgânicos testados na remediação de solos de minas, como por exemplo lamas residuais urbanas e industriais (Alvarenga et al., 2008), composto de resíduos sólidos urbanos (Alvarenga et al., 2009), lamas do tratamento de águas de consumo humano (Alvarenga et al., 2018), entre outros. De uma maneira geral, dependendo das doses utilizadas, os resíduos orgânicos e inorgânicos utilizados nos estudos anteriores demonstraram a sua capacidade na melhoria das propriedades físico-químicas dos solos, para além de terem contribuído para a redução da ecotoxicidade e para o aumento da atividade microbiana.

Em Portugal a indústria da pasta de papel (ou indústria celulósica), produz resíduos com potencial para serem valorizados na correção de solos de minas, nomeadamente as cinzas da combustão da biomassa vegetal, e as lamas produzidas no tratamento das águas residuais dessa indústria (Cruz et al., 2017; Rodrigues, 2017; Alvarenga et al., 2019), pelo que passaremos a fazer a sua apresentação nos subcapítulos seguintes.

2.2.2.1. Cinza de biomassa

A biomassa vegetal pode ser considerada um recurso energético renovável, contribuindo para a redução da dependência dos combustíveis fósseis e para a redução das emissões de CO₂ (Santos, 2019). Da combustão da biomassa para produção de calor e eletricidade, resultam cinzas, as quais podem representar um problema ambiental grave quando se considera a elevada quantidade produzida e a sua composição, da qual podem fazer parte diversos tipos de contaminantes, entre eles metais (Cruz et al., 2017; Rodrigues, 2017). Durante a combustão da biomassa vegetal, são produzidos dois tipos de cinzas: as cinzas de fundo (Código LER 100124, Decisão da Comissão 2000/532/EC), que são descarregadas no fundo do forno, e as cinzas volantes (Código LER 100103, Decisão da Comissão 2000/532/EC), mais finas, recolhidas na parte superior dos fornos ou dos equipamentos de controlo das emissões gasosas, as quais possuem uma composição diferente, normalmente mais rica em nutrientes, mas também em metais potencialmente tóxicos (Tarelho et al., 2015). Como prática comum, e na ausência de legislação específica que incentive a sua valorização, são maioritariamente encaminhadas para aterro (Cruz et al., 2017).

Como as cinzas de biomassa são muito alcalinas, com um valor de pH que pode variar entre 9 e 13), uma das suas formas de valorização é a utilização como corretivo mineral alcalinizante, aumentando o pH e a capacidade tampão de solos ácidos, o que evita a utilização dos tradicionais agentes calantes, como carbonato, hidróxido ou óxido de cálcio (Cruz et al., 2017; Rodrigues et al., 2017). Por outro lado, a aplicação de cinzas de biomassa ao solo é considerada uma maneira sustentável de reciclar alguns elementos nutricionais, como por exemplo o K, P, Mg e Ca (Cruz et al., 2017; Rodrigues, 2017; Alvarenga et al., 2019). Porém, embora a cinza de biomassa contenha muitos nutrientes essenciais para as plantas, o N é libertado para a atmosfera durante a combustão e, portanto, a aplicação de cinzas de biomassa ao solo não compensa a sua deficiência de N, o principal nutriente limitante do seu crescimento (Saarsalmi et al., 2012; Brännvall et al., 2015; Pesonen et al., 2016). Para além disso, alguns autores referem o desequilíbrio de nutrientes que pode ocorrer na composição das cinzas. Por exemplo, a soma da concentração de fósforo e potássio pode não corresponder aos requisitos mínimos para as cinzas serem usadas como fertilizantes em solos florestais (Nurmesniemi et al., 2012). Portanto, ao considerar o uso de cinzas de biomassa como fertilizante do solo, deve considerar-se a necessidade de aplicar outro tipo de corretivo, como composto de RSU, ou, o que é mais vantajoso, as próprias lamas do tratamento das águas residuais dessa indústria (lamas celulósicas) (Alvarenga et al., 2019).

Outra questão relevante, relativamente à utilização de cinzas de biomassa como corretivo de solo, principalmente se são cinzas volantes, é a sua natureza muito pulverulenta, que condiciona bastante o seu transporte e aplicação. Por esse motivo, já existem estudos em que se avalia a possibilidade da sua peletização ou granulação, o que facilita a sua aplicação ao solo (Brännvall et al., 2015). Por vezes essa granulação é feita com a ajuda de outros materiais, nomeadamente efetuando a sua co-granulação com lamas residuais (Pesonen et al., 2016; Alvarenga et al., 2019).

2.2.2.2 Lamas celulósicas

A indústria de pasta de papel é responsável pela produção de grandes quantidades de águas residuais, cujo tratamento leva à produção de lama residuais industriais, muitas vezes agrupadas sob a designação comum de lamas celulósicas (Cabral e Vasconcelos, 1993; Santos, 2015), mas que agrupa lamas de diferentes composições (Cabral e Vasconcelos, 1993; Santos, 2015): as lamas primárias (obtidas na decantação primária), as lamas secundárias, ou biológicas (obtidas na decantação secundária,

antecedida de um tratamento biológico) e as lamas compostadas, obtidas pela mistura das anteriores, submetidas a um processo de compostagem que garanta a sua estabilização. Estas lamas, tendo sido obtidas em diferentes fases do tratamento das águas residuais, apresentam diferenças acentuadas em relação a alguns parâmetros que se consideram de maior interesse na apreciação do binómio fertilização-poluição (Santos, 2015; Rodrigues, 2017). Sendo as lamas celulósicas primárias obtidas no tratamento primário, normalmente por decantação, sem uma decomposição microbiológica adequada, refletem a natureza da biomassa e dos reagentes usados no processo do fabrico, sendo caracterizadas por uma elevada putrescibilidade (Santos, 2015). Pelo contrário, as lamas biológicas são obtidas após tratamento secundário, com degradação microbiana acentuada, que contribui para a libertação de nutrientes essenciais e para a sua estabilização, com uma redução da razão C/N (Santos, 2015), o que as torna bastante mais atrativas para incorporação na correção de solos. Porém, a sua salinidade e a presença de substâncias potencialmente fitotóxicas (Santos, 2015; Alvarenga et al., 2015), poderiam ser melhoradas caso se procedesse à sua compostagem prévia à sua aplicação ao solo.

2.3. Parâmetros de avaliação da qualidade do solo em estratégias de remediação de solos

2.3.1. Parâmetros físico-químicos

As principais limitações, em termos da sua composição química, dos solos afetados por atividades mineiras são a sua acidez, elevada salinidade, baixo teor em matéria orgânica e em nutrientes essenciais, e o seu elevado teor em elementos potencialmente tóxicos (metais e /ou metaloides), na fração total e/ou biodisponível. Por esse motivo, a avaliação do impacto dos tratamentos nestes parâmetros será uma medida o sucesso da ação de remediação dos solos.

Do ponto de vista agronómico, os parâmetros físicos também são considerados importantes, uma vez que estabelecem relações fundamentais com os processos hidrológicos, como por exemplo, a infiltração, drenagem, escoamento superficial e erosão. Os principais indicadores físicos utilizados comumente para avaliar a qualidade de solo, são a textura e estrutura do solo, a profundidade de enraizamento,

compactação e percolação de água, mas eles não foram abordados no âmbito desta tese (Silva, 2006).

A acidez do solo afetado por atividades mineiras é gerada no processo de decomposição da pirite na presença de oxigênio e de água, o qual é bem conhecido, e explica também as concentrações elevadas de anião sulfato nesses solos e nos efluentes mineiros de drenagem ácida (Alvarenga, 2009).

Por outro lado, a oxidação do escombros provoca a libertação de elevadas concentrações de sais solúveis, principalmente cátions e o anião sulfato (Alvarenga, 2009). Estas elevadas concentrações salinas podem afetar o metabolismo e/ou a permeabilidade das membranas das plantas. Por esse motivo, a determinação da salinidade dos solos é um indicador da sua qualidade, a qual pode ser feita pela determinação da condutividade elétrica (CE) no extrato de saturação do solo, ou em extratos de 1:2 ou 1:5 em água (De Varennes, 2003). Ye et al. (2002) referem que, para valores de condutividade elétrica de 4 dS m⁻¹, se verifica a inibição de crescimento e da germinação, o que afeta a produtividade da maioria das culturas. Por outro lado, as ações de remediação preconizadas, que passam pela incorporação no solo de corretivos orgânicos e/ou inorgânicos poderão levar a um aumento indesejável da sua CE, o que permite avaliar a possibilidade de utilizar, ou não, os tipos e doses de corretivos em avaliação.

A matéria orgânica do solo é essencialmente derivada de material vegetal e animal transformada por microrganismos heterotróficos e decomposto na sua totalidade ou parcialmente, sob a influência da temperatura, humidade e condições ambientais do solo. A parte da matéria orgânica decomposta é normalmente designada por húmus, considerado um material com um elevado grau de estabilidade e é onde existem as propriedades coloidais da matéria orgânica (Silva, 2006). A camada de solo com maior teor da matéria orgânica pertence a camada superficial do solo, que apesar de não ter uma intervenção direta na nutrição das plantas, é considerado um dos fatores determinantes na manutenção da fertilidade dos solos, uma vez que melhora as propriedades biológicas e físico-químicas do solo (Kodikara, 2015).

Os solos afetados por atividades mineiras apresentam, normalmente, teores muito baixos de matéria orgânica sendo, consequentemente, deficientes nos nutrientes essenciais para as plantas, como sejam N, P, K, Ca e Mg (Alvarenga, 2009). O deficiente teor em matéria orgânica e em minerais de argila fazem com que estes solos possuam capacidades de troca catiónica baixas, o que os impede de armazenar alguns nutrientes essenciais (Williamson e Johnson, 1981; Alvarenga, 2009). Outra das vantagens que a matéria orgânica manifesta no solo, é a sua contribuição para que o solo apresente

melhor estrutura, com impacto cont nos movimentos de água e do ar, para além de levar ao aumento do poder-tampão do solo, minimizando a oscilação do seu pH (Santos, 2015). Por este motivo, a determinação do teor em matéria orgânica de um solo é um dos indicadores chave para a avaliação da sua qualidade, e das ações de remediação preconizadas, determinação esta que pode ser acompanhada pela determinação do teor de macronutrientes essenciais (N, P e K), e, se possível, a sua capacidade de troca catiónica.

2.3.2. Teores em metais totais e biodisponíveis

Como já se referiu, nos solos afetados por atividades extrativas de minério, podem existir elevadas concentrações de metais e/ou metalóides, que diferem de local para local em função do tipo de minério explorado, bem como dentro do próprio coto mineiro (Alvarenga, 2009). Os metais são elementos potencialmente tóxicos, persistentes no ambiente, com efeitos cumulativos, muitas vezes irreversíveis e que se evidenciam a longo prazo. Entre outros efeitos, a contaminação dos solos com metais pode diminuir a biomassa microbiana do solo e alterar significativamente a estrutura da sua comunidade microbiana (Lenart-Boro e Boro, 2014).

Em Portugal, não estão definidos valores de referência sobre a qualidade dos solos. Ao estudar este compartimento ambiental, os resultados são até agora comparados com os valores de referência das normas de outros Países, nomeadamente as normas Canadianas (*Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*, CCME, 2006). Em 2015, foi apresentado ao governo um projeto legislativo relativo à prevenção da contaminação e remediação dos solos, denominado PROSOLOS, o qual, até a data, ainda não foi aprovado. O Decreto-Lei que irá originar visa suprimir uma importante lacuna na legislação nacional, permitindo assim responder aos vários desafios assumidos a nível nacional da proteção do solo contra a poluição com origem antropogénica.

Uma das principais preocupações a nível da degradação dos solos resultante de uma exploração mineira, está concentrada não só nos elevados teores de metais totais e/ou metalóides, mas, sobretudo na sua biodisponibilidade, uma vez que esta condiciona a sua mobilidade e a sua disponibilidade no solo, assim como o seu estado de toxicidade. A mobilidade e a biodisponibilidade dos metais é influenciada por fatores, como, por exemplo: o pH, os minerais de argila, a concentração de sais e de agentes

complexantes, o teor de matéria orgânica e a sua composição, a presença de óxidos e hidróxidos de Fe, Mn e Al, o potencial redox, e o teor de cátions e aniões na solução do solo. Estes fatores exercem influência nas diferentes reações que ocorrem quando estes elementos potencialmente tóxicos se transferem de uma fase para outra, ao nível das constantes de equilíbrio. Essas reações são: precipitação e dissolução, adsorção e dessorção, complexação e descomplexação (Domingues, 1999; Alvarenga, 2009).

A adsorção refere-se à associação de um ião a uma superfície sólida, por meio de partilha de eletrões (ligações covalentes) ou então, por atração eletrostática (ligação iónica) perante um ião e uma superfície com carga oposta. Os metais presentes no solo podem associar-se a compostos orgânicos e/ou inorgânicos, formando quelatos – reação de complexação. De entre os compostos existentes no solo, os que apresentam uma maior afinidade para os cátions metálicos são os compostos orgânicos, devido à presença de grupos ou ligandos que formam quelatos com o metal. Em condições onde ocorre aumento de pH, também se verifica aumento da afinidade para os cátions metálicos, devido a dissociação dos grupos funcionais carboxílicos, fenólicos, alcóolicos e carbonílicos da matéria orgânica, ou seja, o aumento do pH promove a perda do protão e consequentemente a atribuição de carga negativa (Bui et al., 2019; Dineshkumar et al., 2018).

Em solos ácidos, de um modo geral, os metais estão mais biodisponíveis, o que quer dizer que, se o pH do solo aumentar, diminui a sua solubilidade ou disponibilidade para os organismos (Wuana e Okieiman, 2011).

É importante a avaliação do teor em metais totais de um solo, o que pode ser feito, normalmente, por digestão da amostra de solo com uma mistura de ácidos fortes, como por exemplo a água régia, uma mistura de HCl e HNO₃ numa proporção de 3:1, que é a metodologia que se encontra no procedimento recomendado pela International Organization for Standardization (ISO 11466, 1995).

Por outro lado, a análise da solução do solo seria a forma ideal de medir a biodisponibilidade em metais no solo, num determinado instante. Infelizmente, é difícil obter amostras de solução do solo que sejam representativas de um volume específico de solo, e que contenham concentrações dos contaminantes do solo acima dos limites de deteção analíticos. Não existe nenhum método analítico simples e único que simule a disponibilidade de metais para os organismos do solo, plantas incluídas. Normalmente, utilizam-se soluções extratantes, que são geralmente soluções diluídas (< 1 M) de ácidos orgânicos ou minerais, sais simples e agentes complexantes orgânicos ou inorgânicos, as quais permitem estimar a fração do metal que estaria biodisponível.

Nestes métodos assume-se que os iões associados a alguns dos componentes do solo serão “deslocados” dos seus locais de adsorção pela presença de um excesso de iões da solução extratante competindo por esses locais, permitindo avaliar a sua biodisponibilidade. Apesar do carácter empírico associado à sua utilização, estes extratantes têm-se revelado de grande interesse prático, obviando o problema de não haver nenhum método de medição direto da biodisponibilidade (Alvarenga et al., 2008). Uma das possibilidades de solução extratante, bastante aceite, é a solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,01 M, que simula a extração da fração de metais efetivamente biodisponíveis (fração móvel desses metais) (Alvarenga et al., 2008).

A contaminação dos solos por metais altera a qualidade do solo, afetando o crescimento das culturas e sendo tóxicos para a maioria dos organismos. Contudo, a alteração nas propriedades microbianas no solo não ocorre apenas pela presença de elementos potencialmente tóxicos, mas sim da interação de vários fatores, ao nível das suas propriedades físico-químicas, que concorrem para a sua toxicidade.

2.3.3. Parâmetros biológicos

Devido às características físicas e químicas de solos afetados por atividades mineiras, estes possuem uma atividade biológica reduzida, que persiste durante largos anos, mesmo após a cessação da atividade no local. Qualquer ação de remediação desses solos permitirá uma melhoria das suas características físico-químicas que se deverá repercutir na melhoria das suas propriedades bioquímicas e biológicas.

As propriedades bioquímicas e as biológicas do solo são, em particular, muito sensíveis às suas perturbações, naturais ou antropogénicas, pelo que são frequentemente consideradas os melhores indicadores da perda de qualidade do solo, mas, também, das ações de remediação a que ele possa ser submetido (Ananbeh et al., 2019).

A avaliação da qualidade do solo com base na caracterização da sua atividade microbiológica, poderá ser estimada com recurso à quantificação da biomassa microbiana, determinação da atividade bioquímica relacionada com os ciclos dos nutrientes (e.g. C, N, P e S) e medição da atividade enzimática de determinadas enzimas específicas (e.g. β -glucosidase, fosfatases ácida, celulasas, proteases, urease e desidrogenase) (Alvarenga, 2009). A medição da atividade da desidrogenase, por exemplo, é considerada um bom indicador geral da atividade microbiana no solo, por

ser uma enzima intracelular, cujo, a sua atividade está intimamente ligada à das células. Porém, nos últimos anos, o aparecimento de novas tecnologias e ferramentas moleculares veio revolucionar a nossa compreensão da biodiversidade microbiana e das funções ecológicas, fazendo crescer o interesse no estudo da comunidade de microbiana dos solos. As técnicas moleculares, como extração de DNA e sua amplificação via PCR (do Inglês *Polymerase Chain Reaction*) utilizando *primers* específicos e sequenciação, permitiram grandes avanços nos estudos da diversidade de microrganismo do solo.

No solo, apesar de ser um dos principais reservatórios de diversidade biológica do planeta, estima-se que menos de 1% dos microrganismos sejam explorados (predominantemente fungos as bactérias), e, destes, apenas 1 a 9% das células viáveis são capazes de formar colónias em meios de culturas laboratoriais (Santos et al., 2017; Verma et al., 2017; Satyanarayana et al., 2017). As técnicas tradicionais de cultivo, utilizadas para avaliar a diversidade microbiana, medindo as células ativas em amostras ambientais, permitiram avanços consideráveis na ecologia microbiana, mas, apresentam algumas limitações nos processos de monitorização da biodiversidade, devido às lacunas de conhecimento, mas continua a ser indispensável o seu uso, quando se pretende estudar a comunidade microbiana em amostras ambientais. Como exemplo, temos o método de contagem de placas que, apesar de ser um método que, por si só, não produz resultados suficientes, é um método, rápido e barato e que produz colónias bem separadas, facilitando uma posterior purificação e caracterização (Jolanta, 2015; Tanveer et al., 2016; Satyanarayana et al., 2017; Hermans et al., 2018).

Um exemplo, de uma abordagem independente da cultura, é o isolamento de DNA metagenómico (material genético recuperado diretamente a partir de amostras ambientais), que permite estudar espécies microbianas através da análise dos elementos genómicos sem cultivar os organismos hospedeiros. Alguns estudos já realizados foram baseados em processos para aumentar o rendimento das amostras e qualidade do DNA extraído, recorrendo por exemplo a tratamentos físico-químicos, como exemplo, a sonificação e o batimento de esferas, moenda com azoto líquido, o uso de detergentes (ex: dodecil sulfato de sódio (SDS) ou de ditioneitol (DTT), aplicação de ultrassons, lise direta, uso de agentes caotrópicos, como sais de guanidínio, e alta concentração de tratamentos com lisozima (Satyanarayana et al., 2017). No entanto, algumas destas técnicas mostraram ser inadequados, sobretudo para análise da comunidade de microrganismos por amplificação via PCR, uma vez que podem causar perdas da densidade do DNA e aumentar o risco de haver formação de produtos

quiméricos entre o DNA e substâncias húmicas, degradando a qualidade do DNA extraído (Sagar et al., 2014; Santos et al., 2017; Satyanarayana et al., 2017).

A extração do DNA representa o passo básico e, provavelmente, o mais importante na biologia molecular, sendo-o mais ainda para análises de comunidade microbiana (Dai et al., 2017). Por isso mesmo, segundo alguns autores, é necessário ter em consideração a influência do método de extração nos resultados, visto que são poucas as evidências de como os diferentes métodos de extração de DNA afetam a deteção de diferentes organismos em diferentes tipos de amostras, originando resultados poucos comparáveis e confiáveis (Hermans et al., 2018; Barros, et al., 2019). Alguns estudos afirmam que, para diferentes técnicas de extração de DNA, resultam diferentes quantidades e qualidades de DNA (Smith e Meier, 2005; Waite e Tayler, 2015, citado em Hermans et al, 2018). Isto significa que ainda constitui um grande desafio a utilização de métodos moleculares em estudos da biodiversidade do ecossistema, nomeadamente da matriz solo. A adoção de abordagens de padronização de protocolos de extração de DNA da microbiota existente no solo, e a otimização de métodos, pode ser a solução necessária, para aumentar níveis de precisão, garantindo uma comparação com maior confiança, mesmo entre diferentes estudos, o que pode favorecer a relação custo-benefício da extração de DNA e da amplificação via PCR (Hamedi et al., 2016; Satyanarayana et al., 2017).

A amplificação de DNA via PCR requer o uso de *primers*, que permitem identificar uma determinada espécie em particular, incluindo bactérias (gene 16S rRNA), fungos (sequência ITS2), plantas (sequência ITS2), peixes (gene 12S rRNA) e animais (COI). Por exemplo, os genes de fungos podem assumir iniciadores com a seguinte conjugação de bases azotadas:

5 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GTCGGTAAACTCGTGCCAG C 3', o que os permite identificar (Hermans et al., 2018).

São vários os fatores que podem interferir na metodologia e originar resultados pouco conclusivos e/ou que induzem em erro. Nos últimos anos, vários métodos foram aprimorados, tendo, como exemplo, a combinação de estratégias enzimáticas (lisozima e proteinase K) e químicas (CTAB “Brometo Cetil Trimetil Amónio” e CaCl_2), de modo a garantir uma lise celular eficiente e o uso de PEG (polietilenoglicol) e isopropanol para precipitação de DNA livre de impurezas húmicas (Verma et al., 2017). Têm também sido utilizadas outras técnicas para a purificação do DNA, nomeadamente, processos de centrifugação por densidade com CsCl , floculação química, cromatografia de troca iónica e exclusão de tamanho, eletroforese em gel de agarose seguida de excisão e

extração de DNA da matriz de gel, uso de carvão ativado e complexo enzimático (Frostegard et al., 1999; Zhou et al., 1996; Jackson et al., 1998; Tebbe and Vahjen, 1993; Miller, 2001; Braid et al., 2003 citados por Satyanarayana et al., 2017).

Assim, por meio de diferentes métodos de purificação, várias outras abordagens metodológicas foram exploradas, de modo a minimizar os efeitos negativos desses fatores e maximizar a qualidade do produto obtido. Segundo Satyanarayana, et al. (2017), algumas etapas adicionais da extração e purificação dos extratos são caras e demoradas. Como alternativa, é recomendada o uso de *Kits* comerciais na tentativa de reduzir os custos e o número de etapas associadas à extração do DNA de microrganismos do solo. Todavia, a utilização de um *Kit* comercial no processo de extração de DNA, apesar de ser um método simples, rápido e eficaz, é, ainda, um método caro e que varia muito em função do tipo da amostra. A eficiência de uma extração microbiana de DNA do solo depende também da qualidade da amostra de solo, principalmente do teor de argila e da matéria orgânica, porque os microrganismos podem interagir com coloides do solo, como agregados argila orgânicos (Hamedi et al., 2016; Roose-Amsaleg et al. 2001). De entre os vários *Kits* comerciais utilizados para extração do DNA do solo, o *Dneasy PowerSoil*, utilizado neste estudo, foi identificado por Hermans et al. (2018), como um método adequado para a extração do DNA em vários tipos de amostras.

O solo, sendo um compartimento ambiental com uma grande variedade de elementos e compostos químicos, eventualmente em concentrações elevadas como alguns contaminantes, poderão interagir com a molécula de DNA e inibir o PCR, o que dificulta ou impossibilita alguns procedimentos da biologia molecular. Os ácidos húmicos e alguns compostos fenólicos, são exemplos de substâncias que podem interagir com o DNA, diminuindo a qualidade do mesmo e podendo alterar a atividade da *Taq* DNA polimerase durante o processo de amplificação por PCR. Geralmente os compostos de ácido húmico são co-extraídos com os ácidos nucleicos, o que torna a etapa da purificação do DNA e a remoção do ácido húmico, como sendo as etapas mais importantes no isolamento do DNA (Hamedi et al., 2016; Verma et al., 2017; Satyanarayana et al., 2017).

Como os compostos húmicos absorvem a radiação a 230 nm, as proteínas a 280 nm, e o DNA a 260 nm, a qualidade de cada extrato de DNA é, normalmente, determinada espectrofotometricamente, considerando que os extratos contêm DNA genómico suficientemente puro se tiveram uma razão de absorvâncias obtidas a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}), compreendida entre 1,8 e 2, visto que, esse intervalo contém a

absorvância média ponderada dos nucleotídeos presentes no DNA. Em contrapartida, os valores fora deste intervalo indicam a presença de proteínas, fenóis e/ou outros contaminantes (Hermans et al., 2018; Sagar et al., 2014).

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização dos solos e resíduos utilizados no Ensaio de Campo

A caracterização físico-química dos solos utilizados no Ensaio de Campo foi efetuada no início da montagem do ensaio, tendo sido também analisada a concentração total de alguns dos metais potencialmente tóxicos (Cu, Pb e Zn) existentes nos solos em questão (Tabela 3.1.).

Os solos utilizados são solos de textura grosseira, que se caracterizam por possuírem um pH muito ácido (pH H₂O no extrato 1:2,5 < 4,5; Santos, 1996), teores baixos (0,6-1,6%) ou muito baixos (<0,5%) de matéria orgânica (Santos, 1996), e teores muito baixos de P e K extraíveis (<25 mg kg⁻¹), na maioria das amostras, com exceção do K extraível das amostras de solo do Lousal, com valores baixos (26-50 mg kg⁻¹) e de São Domingos, com valores médios de K extraível (51-100 mg kg⁻¹) (Tabela 3.1.).

Os teores de azoto são baixos, acompanhando os teores baixos de matéria orgânica, enquanto que as salinidades, avaliadas através da CE no extrato 1:5 do solo em água destilada, são elevadas, especialmente nos solos de Aljustrel, e do Lousal.

Relativamente aos teores de metais, na ausência de legislação nacional para definir quais os valores habituais e os valores limites da concentração de metais pesados aceites para o este tipo de solos, os resultados foram comparados com os valores de referência da norma Canadiana para solos de uso agrícola e industrial (CCME, 2006). De acordo com esta norma, verificou-se que os solos da mina de Aljustrel e da Mina de São Domingos apresentam concentrações de Cu e Pb acima dos valores limites para solos de uso industrial, indicativo da sua contaminação com esses elementos. No caso do solo da Mina do Lousal, apenas a concentração de Cu se encontra acima do valor limite da referida legislação, para solos de uso industrial.

O Zn, apesar de não apresentar valores superiores ao valor limite para solos de uso industrial, revelou ainda concentrações elevadas, principalmente na amostra de solo da mina de Aljustrel, a qual ultrapassa o valor limite de Zn para solos de uso agrícola.

Considerando estes resultados, verifica-se que os solos em questão possuem características de solos afetados por atividades mineiras, carecendo de ações de remediação.

Tabela 3.1. Características físico-químicas gerais dos solos utilizados nos ensaios piloto, e comparação dos teores de metais totais com valores de referência (média, n=3). Fonte: Projeto LIFE No_Waste).

Solo da Mina de						
Parâmetro	Unidades	Aljustrel	Lousal	São Domingos	Valores-limite para solos de uso agrícola (*)	Valores-limite para solos de uso industrial (**)
pH		4,05	3,67	3,47		
CE	(mS cm ⁻¹)	3,1	1,53	0,77		
MO	(%, g 100 g ⁻¹)	0,53	0,42	0,21		
N	(%, g 100 g ⁻¹)	0,04	0,05	0,06		
P	(mg P ₂ O ₅ Kg ⁻¹)	18,3	5,9	19,8		
K	(mg K ₂ O Kg ⁻¹)	21,3	33,7	70,1		
Cu	(mg kg ⁻¹)	987	126	183	63	91
Pb	(mg kg ⁻¹)	1745	30	1541	70	600
Zn	(mg kg ⁻¹)	319	109	68	250	410

Legenda: Valores de referência para alguns metais existentes nas normas do Canadá (*Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*, para solos de uso agrícola (*) e para uso industrial (**). Informação acedida em: <http://st-ts.ccme.ca/>, a 09/01/2020) (CCME, 2006).

Relativamente aos resíduos utilizados na correção dos solos no Ensaio de Campo, eles foram: (i) grânulos das cinzas volantes da queima de biomassa vegetal, preparados por mistura de cinza com água, agitados mecanicamente numa betoneira, e secagem/estabilização ao ar livre durante seis meses (Figura 3.1., e Tabela 3.2.); (ii) composto de lamas, do tratamento biológico das águas residuais da indústria da pasta de papel e papel, utilizando como agente estruturante resíduos lenhosos da limpeza das florestas da empresa (tempo de compostagem: seis meses) (Figura 3.2., e Tabela 3.2.); e (iii) mistura, em partes iguais (v/v), de cinzas de biomassa e de lamas biológicas frescas, sem nenhuma estabilização prévia dos materiais.

A preparação dos resíduos foi da responsabilidade da Universidade de Aveiro, tendo sido executada nas instalações da indústria de pasta de papel e papel que cedeu os materiais para este estudo.

Pode observar-se que, de entre os materiais aplicados aos solos, a mistura dos materiais frescos (C+L) possui o pH mais elevado, com uma capacidade de correção da acidez superior, mas uma CE bastante elevada, o que constituirá uma desvantagem para a sua aplicação ao solo, podendo conduzir a aumentos de salinidade dos solos muito acentuados. Por outro lado, a lama biológica compostada (LC), possui os teores de MO, N e P mais elevados dos três materiais, o que permitirá uma melhoria mais acentuada dos parâmetros de fertilidade dos solos.

Tabela 3.2. Composição dos materiais aplicados aos solos (média \pm desvio-padrão, n=3). Resultados reportados à matéria seca (ms). Fonte: Projeto LIFE No_Waste).

Parâmetro	Grânulos de cinzas (GC)	Lamas biológicas compostadas (LC)	Mistura de cinzas + lamas (C+L)
pH	10,5 \pm 0,4	8,0 \pm 0,1	12,0 \pm 0,1
CE (mS/cm)	0,54 \pm 0,07	2,79 \pm 0,06	7,93 \pm 0,59
MO (% m/m)	9,6 \pm 0,6	73,3 \pm 2,4	37,3 \pm 8,2
N _{Kjeldahl} (% m/m)	0,01 \pm 0,01	2,37 \pm 0,11	0,68 \pm 0,11
P total (g/kg)	1,2 \pm 0,3	5,8 \pm 0,4	2,9 \pm 0,2
K total (g/kg)	3,7 \pm 0,7	2,4 \pm 0,1	12,6 \pm 0,4
Ca total (g/kg)	83 \pm 35	108 \pm 2	110 \pm 8
Mg total (g/kg)	7,3 \pm 2,0	4,8 \pm 0,8	9,6 \pm 1,6
Na total (g/kg)	1,4 \pm 0,3	4,2 \pm 0,2	5,6 \pm 0,3



Figura 3.1. Grânulos de cinzas de biomassa.



Figure 3.2. Lamas celulósicas compostadas com resíduos vegetais (Fonte: <https://www.lifenowaste.pt/s/>).

3.2. Descrição do Ensaio de Campo

O Ensaio de Campo foi instalado na Mina de São Domingos, pela EDM, a 19 de maio de 2018, com solos de diferentes minas da Faixa Piritosa Ibérica (Aljustrel, Lousal e São Domingos). Por uma questão logística, foram levados solos das três minas em estudo para a área destinada à montagem do Ensaio de Campo.

A área da Mina de São Domingos é caracterizada por um clima tipicamente Mediterrânico com Verões secos e quentes e Invernos pouco chuvosos e frios. Na região verificam-se as mais baixas precipitações do país e os mais elevados níveis de insolação e temperatura, registando-se ainda, com alguma frequência, a ocorrência de vários episódios climáticos extremos: cheias e secas. A amplitude térmica é muito acentuada; a temperatura média anual é de cerca de 16°C, com a máxima a atingir valores superiores a 40°C e a mínima a situar-se abaixo dos 0°C no Inverno (Quental et al., 2002; Laneiro, 2012).

Foram construídos doze talhões com 100 m² cada (10mx10m), os quais foram impermeabilizados com uma tela de polietileno de alta densidade e cheios com cerca de 40 m³ de solo (quatro talhões para o solo de cada uma das minas) (<https://www.lifenowaste.pt/s/>). De seguida foram incorporados os corretivos, sendo a seguinte a composição de cada talhão (Figura 3.3. e 3.4.):

(1) Talhões de solos com a numeração zero (0), são os talhões de solos utilizados como controlo, que correspondem a apenas solo de cada uma das três minas;

(2) Talhões de solos com a numeração um (1), são os talhões de solos onde foram aplicados apenas grânulos produzidos a partir das cinzas volantes da combustão de biomassa vegetal (GC), estabilizados seis meses ao ar livre (aproximadamente 2,4 toneladas/talhão, o equivalente a uma aplicação de 5% em peso seco de GC);

(3) Talhões de solos com a numeração dois (2), são os talhões de solos utilizados para aplicação de grânulos de cinzas de biomassa (GC) e de lamas biológicas estabilizadas por compostagem (LC), durante seis meses (aproximadamente 2,4 toneladas de GC + 1 tonelada de LC por talhão, o equivalente a uma aplicação de 5% em peso seco de GC e de 2,5% em peso seco de LC); e

(4) Talhões de solos com a numeração três (3), são os talhões de solos onde se aplicou uma mistura em partes iguais (v/v) de cinzas e lamas, sem estabilização prévia por granulação e compostagem (C+L) (3 toneladas em peso seco/talhão, o equivalente a uma aplicação de 3% de cinzas e 2,5% de lamas, peso seco), materiais esses que demos a designação de materiais frescos.

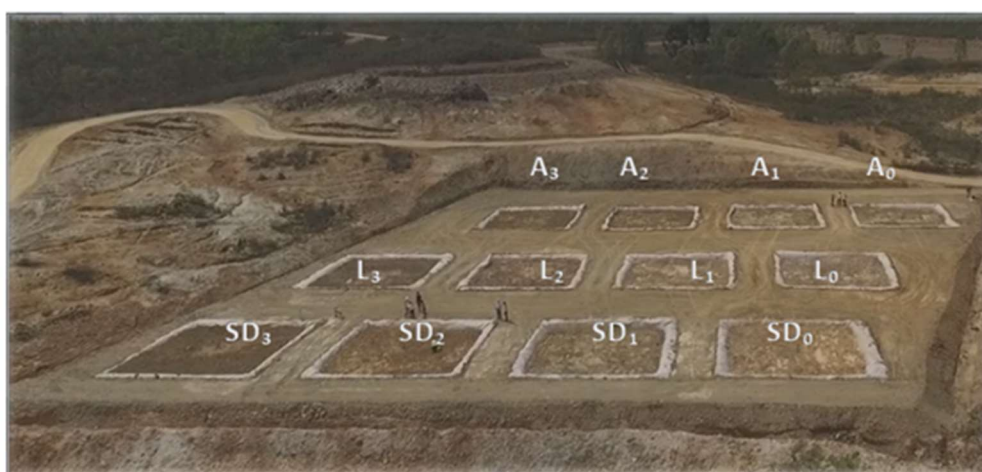


Figura 3.3. Representação esquemática dos talhões do Ensaio de Campo montado na Mina de São Domingos, quatro talhões com os solos de cada uma das minas, com os respetivos tratamentos. (<https://www.lifenowaste.pt/s/>). As letras A, L e SD, corresponde os iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L), respetivamente. 0 - amostras de solos das minas utilizadas como controlo;

Após o estabelecimento do Ensaio de Campo, os solos foram sendo amostrados em momentos diferentes, sendo que, para utilização neste estudo, serão utilizados os resultados obtidos para nos solos recolhidos um, cinco e 10 meses após a aplicação dos corretivos aos solos.



Figura 3.4. Vista dos talhões do Ensaio de Campo na Mina de São Domingos (quatro talhões com os solos de cada uma das minas, com os respectivos tratamentos).

3.3. Metodologias utilizadas na caracterização físico-química dos solos

A caracterização físico-química dos solos foi feita em amostras recolhidas em três datas de amostragem diferentes:

- T1: 29 de junho de 2018 (1 mês após a aplicação dos corretivos nos solos);
- T2: 30 de outubro de 2018 (5 meses após a aplicação dos corretivos nos solos);
- T3: 4 de março de 2019 (10 meses após a aplicação dos corretivos nos solos imediatamente antes da sementeira).

Foi recolhida uma amostra composta por talhão, na camada 0-20 cm, correspondente a cinco subamostras colhidas em pontos diferentes do talhão.

Os solos foram secos ao ar e crivados, tendo-se analisado a fração fina (< 2 mm), relativamente aos seguintes parâmetros:

- pH (H_2O), na proporção 1:2,5 m/v em água destilada;
- Condutividade elétrica (CE), na proporção, 1:5 m/v (mS/cm);
- Matéria orgânica (método de Walkley-Black) (% m/m, concentração expressa em percentagem mássica na matéria seca, ms) (Walkley e Black, 1934);

-
- Azoto Kjeldahl (N_{Kj}) (% m/m ms) (Bremner, 1960);
 - P e K extraíveis, método de Ehner-Rhiem (g P_2O_5 /kg e g K_2O /kg, respetivamente) (Riehm, 1958).
 - Teor de metais extraíveis com $CaCl_2$ 0,01M, na proporção 1:10 m/v, agitação de vaivém durante 2 h e extração através de filtro 0,45 μ m de poro (Alvarenga et al., 2008a; 2009a). Determinação dos metais foi feita por Espectrofotometria de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES).

Todos as análises foram feitas em triplicado e os resultados obtidos corrigidos à matéria seca (ms). Descrição detalhada dos métodos em Alvarenga et al. (2009a).

As análises aos parâmetros pH, CE, teor em MO, N Kjeldahl, P e K extraíveis foram efetuadas nos Laboratórios da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja e as análises aos metais foram feitas na Universidade de Aveiro, no âmbito do Projeto Life No-Waste.

3.4. Metodologias de avaliação de atividade biológica

3.4.1. Atividade enzimática da desidrogenase

A determinação da atividade enzimática da desidrogenase foi efetuada nos solos recolhidos nos três períodos de amostragem, T1, T2 e T3. A análise é feita em amostras de solos frescas, analisadas num prazo máximo de quatro dias após a recolha, de modo a evitar a diminuição da viabilidade dos microrganismos.

O procedimento analítico de determinação da atividade enzimática da desidrogenase baseia-se na redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a trifenílformazan (TPF), uma vez que, na ausência de oxigénio, o TTC atua como aceitador final de eletrões. A solução de TTC é adicionada à amostra de solo sendo a mistura incubada a 25°C durante 16 h. O TPF libertado é extraído com acetona e determinado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 485 nm (Chander e Brookes, 1991; Tabatabai, 1982; ISO 23753-1, 2002).

Todos os resultados obtidos foram corrigidos à matéria seca (ms), após a sua determinação até peso constante a 105°C, sendo apresentados em μ g TPF/g ms/16 h.

3.4.1. Avaliação molecular via amplificação por PCR com primers específicos para bactérias e fungos

3.4.1.1. Extração do DNA

A avaliação molecular das amostras de solos em estudo, incluindo a quantificação da carga microbiológica dos solos, extração de DNA e sua amplificação via PCR, foram ensaios realizados em Lisboa, nos Laboratórios de Biologia Molecular e Micropopagação de Horticultura do Instituto Superior e Agronomia.

Para o isolamento do DNA, apenas foram utilizadas amostras de solos recolhidas no período T3, ou seja, amostras recolhidas dez meses após a aplicação dos corretivos nos solos, imediatamente antes da sementeira. Para a extração do DNA dos microrganismos do solo, foram estudados e testados, quatro métodos de extração, nomeadamente, o método do fenol-clorofórmio, o protocolo modificado de Porteous e Armstrong, método manual e o Kit Dneasy PowerSoil.

As amostras de solos foram inicialmente, secas a temperatura ambiente, moídas e crivadas. Para além das amostras de solos das três minas em estudo (Aljustrel, Lousal e São Domingos), foi utilizada uma amostra de solo da Tapada da Ajuda, usada como controlo positivo, por ser um solo não degradado, permitindo assim, avaliar a eficácia dos quatro métodos de extração em diferentes amostras de solos. Após a sua aplicação laboratorial, todos os métodos de extração foram reajustados, introduzindo um pré-tratamento das amostras com azoto líquido, que permite a libertação de conteúdos celulares, de modo a otimizar o processo de extração.

Para o método do fenol-clorofórmio, preparou-se o tampão lise (50Nm Tris pH8,3 + 40Nm EDTA + 0,75 M sacarose), Este método de extração do DNA, inclui processos de centrifugação, incubação, agitação, banho maria, precipitação e congelação de amostras, de acordo com os procedimentos descrito em Barros et al. (2019). As soluções utilizadas neste método foram, solução lise, cloreto de sódio (NaCl) proteinase K, brometo cetil trimetil amônio (CTAB) e o detergente SDS. Após a extração, avaliou-se a qualidade dos extratos através da análise espectrofotométrica e da análise eletroforética em gel de agarose 1,2 %.

Em relação ao protocolo modificado descrito por Porteous e Armstrong (1991) citado em Sagar et al. (2014), foi um dos métodos de extração escolhido por ter apresentado maior rendimento de DNA, com menor concentração de ácido húmico, todavia também se usou o detergente SDS e a solução NaCl, mas a remoção de ácido húmico deu-se pelo

uso de PEG. Este método foi testado segundo os procedimentos e recomendações citados em Sagar, et al. (2014).

O método manual foi realizado a partir de uma toma de 750 mg de amostra de solo, à qual se juntou uma solução de 4% de leite desnatado (equivalente a 1 ml de leite desnatado). Após a mistura no vórtex, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido num tubo de recolha. Ao sobrenadante, adicionou-se 2 ml de tampão de extração com SDS (SDS 0,3%, NaCl 0,1 M, CH₃COONa 50 M pH 5,1) e, de seguida foram misturados no vórtex, durante 2 minutos. Depois, adicionou-se ao tubo igual volume de fenol e agitou-se novamente no vórtex, durante 2 minutos. O tubo foi centrifugado a 12 000g por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. O DNA foi precipitado com igual volume de isopropanol e congelado a -20°C por uma hora. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12 000g durante 10 minutos, e o fragmento de DNA foi lavado com etanol 70%, e seco ao ar.

Para finalizar, o fragmento de DNA foi dissolvido em água esterilizada e o extrato foi armazenado no congelador a -20°C (Tanveer et al., 2016). Após a extração, procedeu-se à avaliação dos extratos de DNA.

Na extração do DNA pelo uso do Kit de extração, DNeasy®PowerSoil®, procedeu-se conforme as instruções e as recomendações do protocolo dos fabricantes (Anexo A). A extração de DNA foi realizada a partir de 250 mg de amostra de solo, seca à temperatura ambiente, moída e crivada.

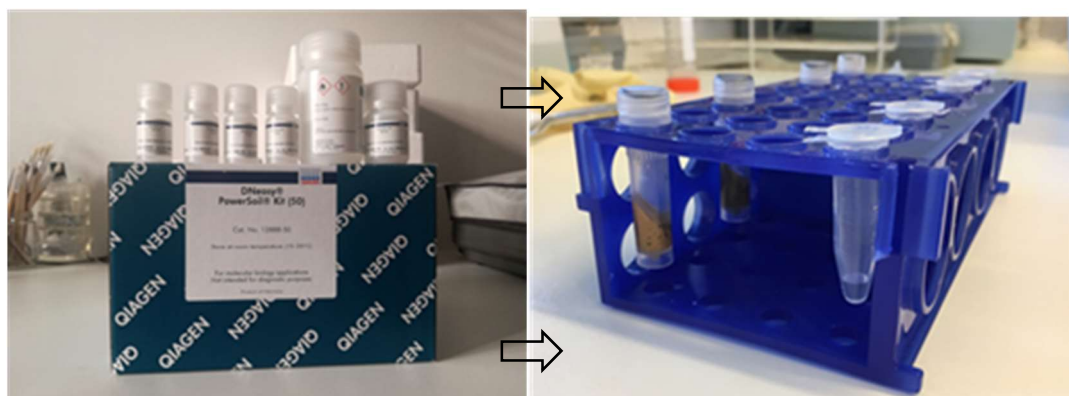


Figura 3.5 – Extração do DNA, pelo método do Kit DNeasy®PowerSoil®

3.4.1.1. Análise espectrofotométrica

Após a extração do DNA, fez-se a avaliação da qualidade e quantidade de extrato do DNA, através da análise espectrofotométrica e análise eletroforética em gel agarose a 1,2%. Na análise espectrofotométrica, para além da absorvância a 260 nm (para a quantificação dos ácidos nucleicos), mediu-se também a absorvância a 230 nm e a 280 nm, para determinar o grau de contaminação com ácidos húmicos, polissacáridos e polifenóis/proteínas, usando a razão $A_{260 \text{ nm}} / A_{230 \text{ nm}}$ (DNA / ácido húmico) e $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ (DNA / polifenóis, proteína). A avaliação espectrofotométrica foi realizado num espectrofotómetro **GeneQuant pro** (RNA/DNA Calculator), com a diluição dos extratos do DNA de 1/10 (indicando que numa cuvete de quartzo de 50 µl contém 10 µl de extrato e 40 µl de água destilada esterilizada).

Como já foi referido nos pontos acima, a quantificação do DNA no extrato de cada amostra de solo foi determinada medindo a absorvância a 260 nm, onde cada unidade de $A_{260 \text{ nm}}$ equivale a 50 µg/ml da concentração do DNA, e tendo em conta o factor de diluição.

A seguir à análise espectrofotométrica, procedeu-se à quantificação através da análise eletroforética em gel agarose de 1,2%, dando início com a preparação do gel de 200 ml num balão Erlenmeyer de 1000 ml, pela mistura de 4 ml da solução tampão 50xTAE (Tris-acetado EDTA, Sambrook et al., 1989) com 2,4 g de agarose e água destilada esterilizada. A mistura foi submetida a uma temperatura elevada, tendo-se, após o seu arrefecimento e a solidificação, formado gel. A cada preparação do gel agarose, no início do arrefecimento, adicionou-se 5 µl de Greensafe (NZYtech), usado para corar os ácidos nucleicos, permitindo a deteção do mesmo, num transiluminador de ultravioleta numa câmara escura.

Antes da sua visualização num transiluminador, os extratos do DNA, correspondentes a cada amostra de solo, foram corridos em gel previamente preparado numa tina de eletroforese com a solução de 1xTAE, durante 60 minutos e a 100 V. Cada carregamento foi preparado a partir de uma toma de 10 µl de cada extrato do DNA, combinados com 2 µl de bromofenol. Em paralelo, fez-se também o carregamento do marcador λ HindIII-EcoRI, após a mistura de 1 µl do marcador, com 9 µl de água destilada esterilizada e 2 µl de bromofenol.

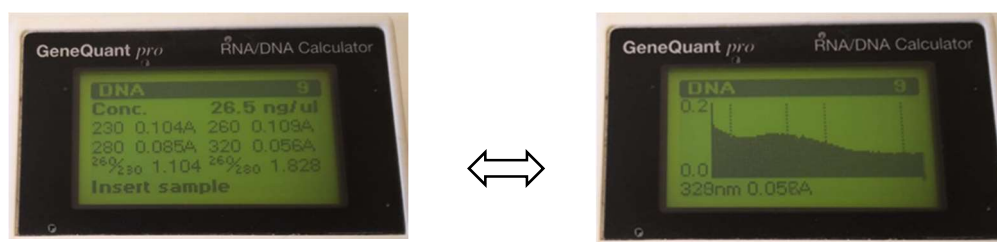


Figura 3.6 - Gráficos das leituras das absorvância com a sua respectiva curva de absorvância, em análise espectrofotométrica

3.4.1.2. Reações de PCR para bactérias

A seguir à avaliação da qualidade do extrato do DNA, procedeu-se à sua amplificação via PCR, usando iniciadores (*primers*) específicos do gene B2TF, usando os iniciadores direto B2TF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3') e reverso V1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Sagar, et al., 2014). Todas as reações de PCR foram preparadas para um volume total igual a 25 µl, dos quais 20 µl corresponde a uma mistura (mix) composta por vários reagentes, e os 5 µl à amostra do DNA molde de cada amostra. Todas as reações de PCR foram preparadas com água destilada esterilizada, solução 10xPCR buffer, MgCl₂, dNTP_s, PrimerF, PrimerR e por último a *Taq* polimerase (Supreme NZY Taq II DNA poly), e em quantidade descrita na Tabela 3.3.

Após a preparação da mistura, os tubos com os reagentes foram para a centrifugação a 13 000g durante 1 min, visando obter uma mistura mais homogênea. Em cada tubo adicionou-se 5 µl de extrato de DNA de cada amostra e, de seguida, foram centrifugados a 13 000g durante 1 min. Por último, adicionou-se óleo mineral nos tubos de modo a evitar perdas de volume por evaporação durante a reação de amplificação.

Tanto a reação de PCR das bactérias, como a dos fungos foram realizadas no termociclador UNO-Thermoblock (Biometra). A PCR das bactérias foi realizada de acordo com o seguinte programação térmico: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificações a 94°C por 45 s, emparelhamento dos *primers* a 52°C por 45 s, extensão das cadeias a 72°C por 45 s seguidos de um período de extensão final a 72°C por 5 min. Após o término dos 35 ciclos, os tubos com a reação foram retirados do termociclador e procedeu-se a preparação para carregamento em gel de agarose de 2%.



Figura 3.7 - Termociclador para amplificação do PCR

Tabela 3.3. Compostos da reação do PCR, respetivos volumes a adicionar à mistura, mix, para as 12 amostras.

Composto	Concentração final	Vol. a adicionar (p/ 20 µl)	Vol. a adicionar (p/ o mix das 12 amostras)
10x PCR buffer	1 X	2,5	33 µl
MgCl₂	2.5 mM	1,25	16,5 µl
dNTPs	0.2 Mm cada nucleótido	0,5	6,6 µl
PrimerF	0.2 µM	0,5	6,6 µl
PrimerR	0.2 µM	0,5	6,6 µl
Taq		0,1	1,32 µl
dH₂O		Perfazer para 20 µl	193,38 µl

*a mistura foi preparada com 10% de margem, para garantir que era suficiente para todas as amostras.

3.4.1.3. Reações de PCR para fungos

Tanta a reação de PCR das bactérias, como a reação e fungos foram preparadas sob a mesmas quantidades, ou seja, 25 µl, dos quais 20 µl é a mistura, o mix, e 5 µl o extrato de DNA molde de cada amostra. Para cada reação foi preparado 12 tubinhos correspondente ao número total de amostra de solos estudados. Para as reações de PCR dos fungos, os *primers* utilizados foram ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

(Sharma et al., 2013). A amplificação do DNA dos fungos procedeu-se também no termociclador, com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificações a 94°C por 45 s, 56°C por 45 s, 72°C por 45 s, seguidos de um período de extensão a 72°C por 5 min. De igual modo, os produtos da amplificação do DNA dos fungos, foram também corridos em gel agarose de 2% numa tina de eletroforese.

3.4.1.4. Análise eletroforética em gel agarose de 2%

Após aplicação da técnica de PCR, os produtos da reação do PCR, foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 2%, com carregamento com o volume total igual a 10 µl dos produtos da reação do PCR..

Antes do carregamento dos produtos da reação do PCR nos poços localizados nas extremidades do gel, houve uma preparação dos mesmos, onde mediu-se 10 µl do produto da reação de PCR de cada amostra em estudo, que combinaram com 2 µl de bromofenol. Em simultâneo, também foi preparado um carregamento, com 9 µl de água esterilizada, misturado com 2 µl de bromofenol e 1 µl de marcador 100 bp Ladder Plus, utilizado para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA, quando comparadas com a intensidade das bandas visualizadas no marcador.

Feitas estas preparações, as amostras foram carregadas no gel e uma corrente elétrica foi acionada. O gel utilizado nesta determinação, gel de 2% de agarose, foi preparado como anteriormente descrito, apenas corrigindo a quantidade de agarose. Igualmente, adicionou-se ao gel, 5 µl de Greensafe (NZYtech), para visualização das bandas do DNA numa câmara escura, num transiluminador de ultravioleta.

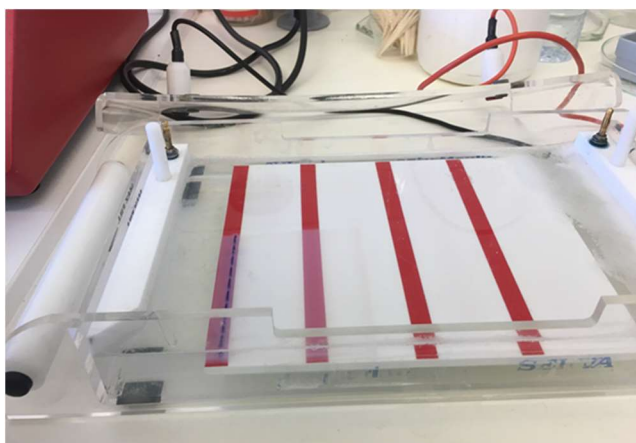


Figura 3.8 - Electroforese em gel de agarose 2% (p/v) do produto de PCR.

3.4.2. Avaliação microbiológica por plaqueamento de fungos e bactérias

3.4.2.1. Preparação dos meios de culturas (LB e PDA)

A avaliação da atividade microbiana do solo através do plaqueamento, teve início com a preparação dos dois meios de cultura para o crescimento dos microrganismos, nomeadamente o meio de Luria-Bertani (LB) para o crescimento das bactérias e o meio de batata dextrosada (PDA), para o crescimento dos fungos. Para o meio de cultura LB, mediu-se 25 g de LB BROTH (High Salt) e 14 g de Agar bacteriological, para 1L de água destilada esterilizada. Após a dissolução dos reagentes em 500 ml de água esterilizada, adicionou-se gotas de hidróxido de sódio (NaOH 1 M), até equilibrar o pH da mistura para 7,2. De seguida, adicionou-se ao meio H₂O destilada esterilizada, perfazendo o volume necessário.

Para a preparação do meio de cultura PDA, para o crescimento dos fungos, apenas foi necessário dissolver 14g de DifcoTM Potato – Dextrose Agar (ref: 213400) em 1L de água destilada esterilizada.

Feitas estas preparações, ambos os meios foram deixados no autoclave para serem esterilizados a 120°C, 1 bar, por durante 20 minutos. Após este período, os frascos com o meio de cultura LB e PDA, foram recolhidos e postos à temperatura ambiente até haver um pré-arrefecimento dos dois meios de cultura. Posteriormente, os frascos foram recolhidos para a bancada de fluxo laminar, previamente limpa, e procedeu-se a distribuição do volume em placas de Petri. Após a solidificação do meio, as placas foram devidamente seladas com parafilme e identificadas, segundo as minas e o tratamento que foram submetidos. Ainda, em relação ao meio de cultura PDA, para o crescimento dos fungos, após o pré-arrefecimento, adicionou-se um antibiótico ao meio de cultura (200 µl de Canamicina 50 mg/ml), de modo a impedir o crescimento de microrganismos bacterianos sobre as colónias fúngicas em placas PDA.

De modo a evitar possíveis contaminações durante a preparações das placas e a distribuição dos meios de culturas em placas de Petri, todas estas preparações foram executadas dentro de uma câmara de fluxo laminar, de modo a garantir um ambiente totalmente limpo, livre de contaminações.

3.4.2.2. Incubação das bactérias e dos fungos

As amostras de solos utilizadas neste processo para quantificar a comunidade microbiana (bactérias e fungos), presentes neste tipo de solos, foram secas à temperatura ambiente, moídas e crivadas. O extrato de solos usado nesta técnica de plaqueamento foi preparado a partir de 100 mg de cada amostra de solo, adicionado num tubo de 2 ml com 250 µl de água esterilizada, fazendo-se a homogeneização da mistura por 10 min num vortex, seguida da centrifugação durante 1 min a 13 000g. Como resultado final obtivemos tubos com sobrenadantes a quem demos a designação de extrato, e uma parte sólida, ainda com alguma percentagem de humidade.

Também com o intuito de evitar possíveis contaminações, o processo do plaqueamento foi realizado numa câmara de fluxo laminar devidamente desinfetada com álcool. Todos estes processos foram realizados sob o uso de luvas e com auxílio de outros materiais (lâmparina, micropipetas e anças). Todos os extrato de solos, correspondentes a cada amostra de solo, foram usados e plaqueados nos dois meios de cultura e em duas quantidades diferentes, ou seja, cada extrato de solo foi plaqueada nos dois meio de cultura e, em duas placas para cada meio, sendo uma placa com 10 µl e outra com 100 µl de extrato, de modo a verificar o gradiente de crescimento das culturas.

O processo do plaqueamento deu-se início primeiramente em placas LB, com o meio de cultura para o crescimento das bactérias. Cada extrato foi depositado para o centro da placa e, com auxílio de uma ança, esterilizada com álcool e em chama, o extrato foi cuidadosamente espalhado ao longo de toda a placa e, de modo a evitar a perfuração dos meios. As sequências da distribuição dos extratos pelas placas, foram sempre de menor volume, 10 µl, para o maior, 100 µl. De igual modo, procedeu-se o plaqueamento em meio de cultura PDA, contabilizando um total de 48 placas, sendo 24 com culturas LB e os outros 24 com cultura de PDA. De modo a evitar possíveis contaminações dos meios, todas as placas foram devidamente identificadas e seladas com o parafilme. As placas com o meio de cultura PDA, para o crescimento dos fungos, foram deixadas à temperatura ambiente e as placas LB, para o crescimento das bactérias, foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Como os fungos são microrganismos de crescimento lento, as placas PDA, para o crescimento das colónias de fungos, foram expostas à temperatura ambiente por durante 3 a 5 dias. Após este período, as placas foram recolhidas e armazenadas a 4°C, procedendo-se depois a contagem das colónias.

3.5. Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados obtidos para a análise físico-química dos solos e para a atividade enzimática da desidrogenase foram sujeitos a uma análise de variância a uma via (ANOVA), de modo a verificar se havia diferenças estatísticas entre os resultados ($p < 0,05$). Sempre que foram encontradas diferenças significativas, as médias foram discriminadas utilizando o teste *post-hoc* Tukey HSD ($p < 0,05$).

A análise estatística foi efetuada utilizando o programa STATISTICA 7.0 (Software™ Inc., PA, USA, 2004).

4. Resultados e discussão

4.1. Influência dos tratamentos nas características físico-químicas dos solos em estudo

A determinação das propriedades físico-químicas dos solos das três minas em estudo, foram realizadas nos Laboratórios da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, ao abrigo do Projeto LIFE No_Waste. É importante analisar estes resultados, porque nos permitem explicar alguns dos resultados obtidos na análise microbiológica destes solos.

4.1.1. Influência dos tratamentos no pH dos solos

Os solos utilizados no Ensaio de Campo são caracterizados por serem ácidos ou muito ácidos, com valores compreendidos no intervalo de 3,5 a 5. Comparando os resultados obtidos entre os três períodos analisados (T1, T2 e T3), nas mesmas amostras, verificou-se que houve um aumento de pH mas, com diferenças pouco significativas ao longo do tempo (Figura 4.1.).

Em relação aos resultados obtidos para os diferentes corretivos aplicados aos solos, verificou-se um aumento significativo do pH nas amostras de solo em estudo, para valores no intervalo de pH 7- 8, com destaque para a aplicação da mistura de cinzas de biomassa e lamas biológicas (C+L). Caso o objetivo final desta correção fosse apenas aumentar o valor de pH dos solos para valores próximos da neutralidade, poderia ser considerada apenas a aplicação de grânulos de cinza de biomassa (GC), uma vez que houve um aumento significativo do pH por aplicação deste corretivo. Porém, tendo em conta a valorização destes materiais, e o custo associado aos seus tratamentos e aplicação, os resultados demonstraram que, para a correção do pH do solo bastará a aplicação da mistura de cinzas de biomassa e lamas biológicas (C+L).

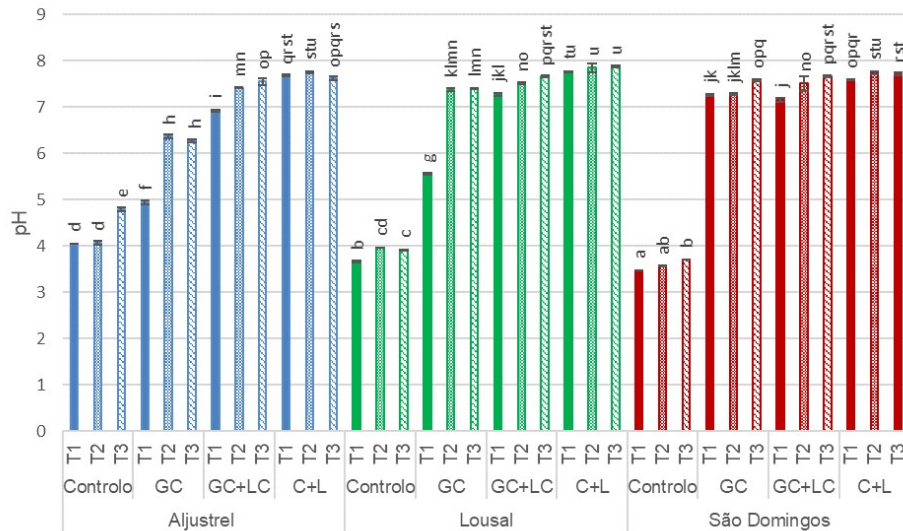


Figura 4.1. Valores de pH nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.

4.1.2. Influência dos tratamentos na condutividade elétrica dos solos

Os resultados obtidos para a CE evidenciaram diferenças que não são muito significativas entre as amostras de solo da mesma mina, quando submetidas a diferentes tipos de tratamento, ou sem uma tendência de variação consistente. É ainda evidente que, o teor mais ou menos elevado de CE se deve mais ao local de origem do solo, do que à aplicação de corretivos.

As amostras de solo da mina de Aljustrel foram as que se apresentaram valores de salinidade maiores, com valores de CE superiores a 3 mS/cm nalguns casos, classificados como solos fortemente salinos, onde só se poderão estabelecer culturas com maior resistência à salinidade (Silva, 2006). Estes valores mais elevados de CE já eram caraterísticos do próprio solo utilizado no ensaio, e não uma consequência da aplicação dos corretivos. Pelo contrário, o solo da Mina de São Domingos era o que, à partida, se caraterizava por uma menor salinidade, sendo por isso mais afetado pelos tratamentos, com um aumento da sua CE como consequência da sua correção.

Para as amostras da Mina de Aljustrel e de São Domingos, o teor mais elevado de sais foi observado em amostras de solos tratados com C+L.

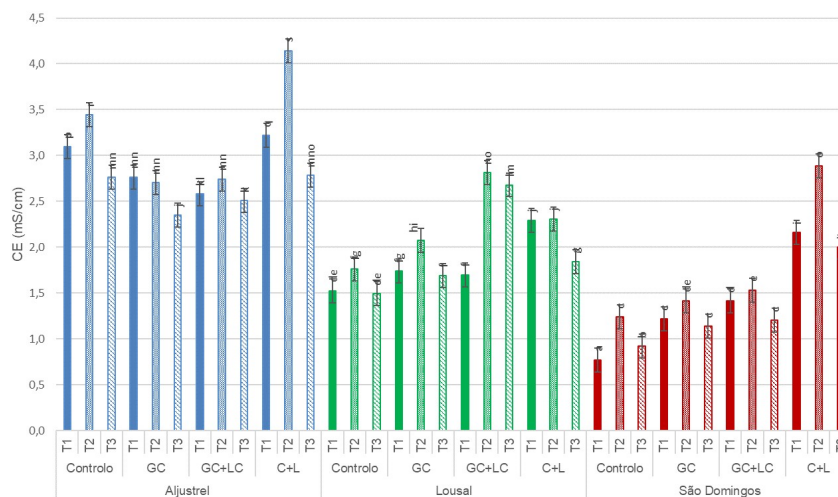


Figura 4.2. Valores de CE nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.

4.1.3. Influência dos tratamentos nos teores de matéria orgânica dos solos

O principal objetivo da aplicação de corretivos orgânicos no solo é permitir o aumento do seu teor em matéria orgânica. Originalmente, os solos das três minas em estudo são muito pobres em matéria orgânica (Figura 4.3.). Foi possível um aumento muito significativo do teor de MO dos solos quando a sua correção foi feita com grânulos de cinza + composto de lamas, ou com cinzas + lamas não estabilizadas, permitindo um aumento do teor em MO de valores considerados muito baixos ($\leq 0,5\%$) para valores médios (1,6 – 3%) (LQARS, 2006). Por outro lado, verificou-se que, a aplicação de grânulos de cinza, por si só, não foi suficiente para permitir um aumento significativo do teor em MO (Figura 4.3.).

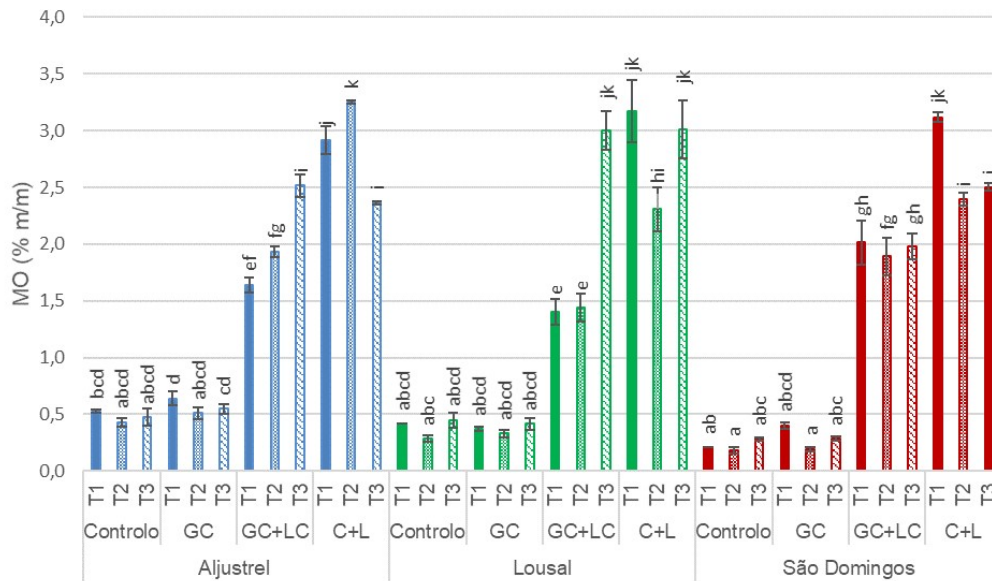


Figura 4.3. Valores de MO nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média +/- desvio padrão, n=3). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p > 0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.

4.1.4. Influência dos tratamentos no teor de azoto Kjeldahl dos solos

O padrão de variação do teor em N_{Kj} em função dos tratamentos aplicados ao solo segue, de uma forma geral, a mesma tendência de variação do teor em MO. O aumento mais significativo foi observado em solos tratados com cinzas + lamas biológicas, enquanto a aplicação de grânulos de cinza de biomassa não contribuiu para o enriquecimento do solo nesse nutriente essencial. Estes solos apresentavam, inicialmente, teores de N_{Kj} inferiores a 0,05% m/m, como é o caso de solo das minas de Aljustrel e, com a aplicação das cinzas de biomassa + lamas biológicas atingiram valores entre 0,25-0,3% m/m em T1 e T2, ou seja, o uso desses resíduos conduziu a um aumento do teor de N_{Kj} superior a 5x.

Comparando os resultados obtidos em diferentes períodos de amostragem em solos tratados com os resíduos estabilizados, GC+LC, foi possível observar um aumento gradual do N_{Kj} ao longos dos três períodos de amostragem. O mesmo não se verificou em solos tratados com os resíduos não estabilizados, onde se verificou uma maior variação dos resultados.

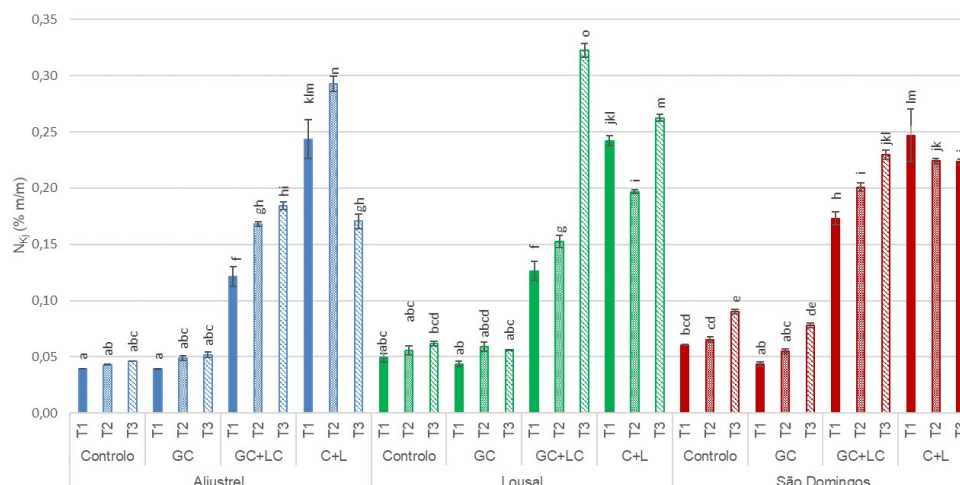


Figura 4.4. Valores de N_{Kj} nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média \pm desvio padrão, $n=3$). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.

4.1.5. Influência dos tratamentos nos teores de P e K extraíveis

O potássio e o fósforo, juntamente com o azoto, pertencem ao grupo dos chamados macronutrientes principais, ou seja, nutrientes essenciais para as plantas em maiores quantidades. Anteriormente, já foi referida a deficiência dos solos em estudo em fósforo, sendo considerados de baixa fertilidade de acordo com os teores em fósforo extraível ($P_{extraível}$) (Tabela 3.1.; valores entre 26 a 50 mg P_2O_5 /Kg) (LQARS, 2006).

A utilização de algumas das misturas na correção dos solos permitiu aumentar o teor de $P_{extraível}$, com resultados mais significativo quando a aplicação dos grânulos de cinza ou da cinza foi acompanhada de composto de lamas ou de lamas não estabilizadas (GC+CL ou C+L). Evidencia-se assim a importância dos resíduos orgânico no fornecimento deste nutriente.

Relativamente ao teor de potássio extraível nos solos ($K_{extraível}$), foi possível aumentar os seus teores extraíveis de classes de fertilidade muito baixas (solo das minas de Aljustrel e Lousal, com teores inferiores a 50 mg de K_2O e P_2O_5 /kg), ou classe de fertilidade média (solo da mina de São Domingos, com teores próximos de 100 mg/kg), para classes de fertilidade altas ou muito altas (Figura 4.6.). Também para o $K_{extraível}$ os

teores mais elevados foram observados por aplicação de cinza acompanhada de composto de lamas ou de lamas não estabilizadas (GC+CL ou C+L).

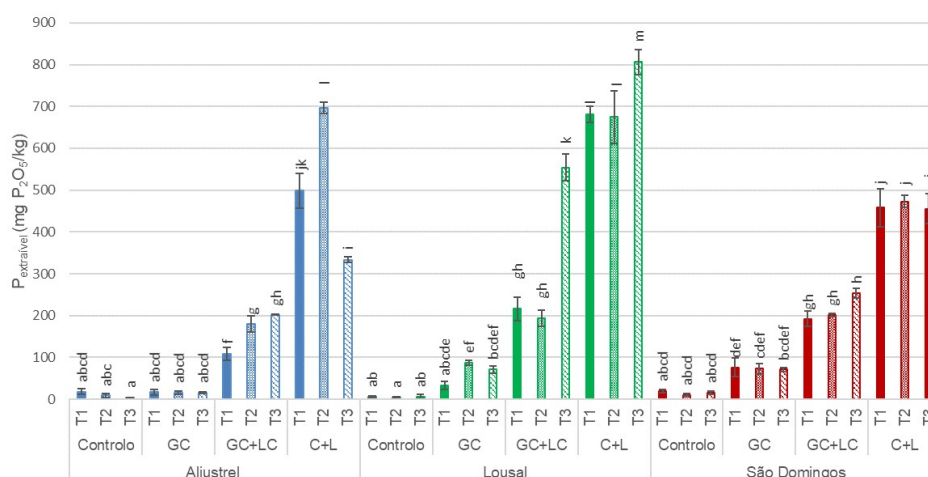


Figura 4.5. Teores de fósforo extraíveis ($P_{extraível}$), nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média \pm desvio padrão, $n=3$). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.

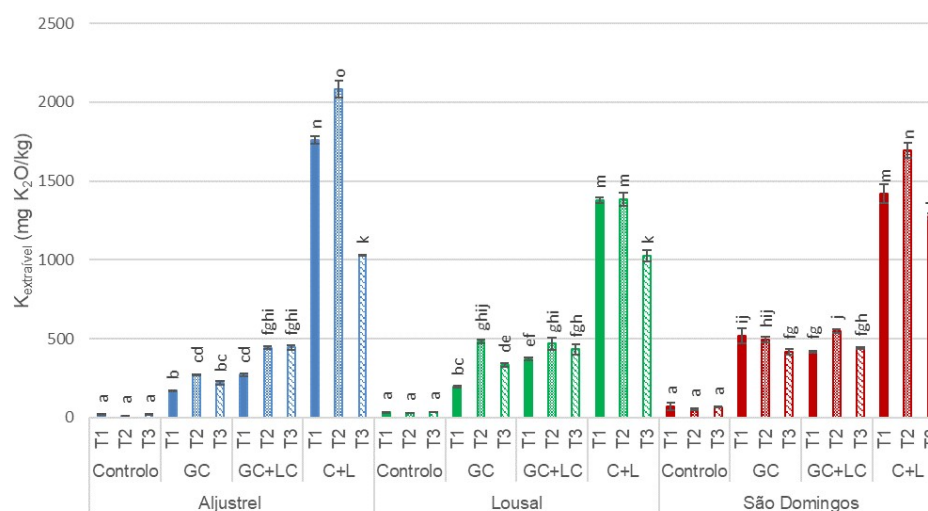


Figura 4.6. Valores de potássio extraíveis ($K_{extr.}$) nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem, T1, T2 e T3 (média \pm desvio padrão, $n=3$). Colunas marcadas com a mesma letra não têm diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $p>0,05$). GC: Grânulos de cinza; LC: lamas compostadas; C+L: mistura de cinzas com lamas frescas. Fonte: Projeto Life No-Waste.

4.2. Influência dos tratamentos nos teores de metais extraíveis dos solos

Assim como o pH, a biodisponibilidade dos metais totais é afetada por outras propriedades do solo, como por exemplo, a textura do solo e o seu teor em MO (Stemmer et al., 2007). Porém, o pH do solo é, de facto, um dos fatores que mais condiciona a mobilidade, extratabilidade ou biodisponibilidade dos metais no solo. Segundo alguns autores, a biodisponibilidade dos metais diminui com o aumento do pH (Wuana e Okieiman, 2011). Este facto é corroborado pelos resultados obtidos neste estudo onde foi possível observar que, nas amostras de solos onde o pH é mais baixo, caso dos solos das minas sem nenhum tipo de correção, onde os pHs variam entre 3,67 e 4,05, é também onde a extratabilidade dos metais é maior (Tabela 4.1).

Para todos os metais analisados, após a aplicação dos corretivos ao solo, mesmo no caso da aplicação só dos grânulos de cinza, houve diminuição dos metais extraíveis por CaCl_2 0,01M, diminui significativamente, o que é um bom indicador da eficácia dos tratamentos na imobilização dos metais potencialmente tóxicos nos solos.

Tabela 4.1. Teores de metais extraíveis com CaCl_2 0,01 M nos solos de cada um dos talhões do Ensaio de Campo, nos três tempos de amostragem (média, $n = 3$). Resultados reportados à matéria seca.

Tratamento		T1			T2			T3		
		Cu	Pb	Zn	Cu	Pb	Zn	Cu	Pb	Zn
Aljustrel	Controlo	16,94	0,04	88,31	16,48	0,30	147,75	1,77	0,07	64,45
	GC	1,13	<LQ	35,58	0,12	0,15	0,29	0,05	0,22	<LQ
	GC+LC	0,17	<LQ	0,15	0,56	0,11	<LQ	0,17	<LQ	<LQ
	C+L	1,40	<LQ	0,25	0,95	0,07	<LQ	0,97	0,06	1,85
Lousal	Controlo	21,07	0,12	28,21	8,12	0,08	16,63	10,34	<LQ	16,44
	GC	0,52	0,07	0,87	0,05	<LQ	<LQ	0,05	<LQ	<LQ
	GC+LC	0,78	<LQ	<LQ	0,16	<LQ	<LQ	0,09	<LQ	<LQ
	C+L	1,05	<LQ	0,16	1,30	<LQ	<LQ	0,53	<LQ	<LQ
S. Domingos	Controlo	38,87	99,94	54,72	23,29	86,95	32,11	27,57	57,16	25,35
	GC	0,07	1,89	0,09	0,07	0,61	<LQ	0,09	0,51	<LQ
	GC+LC	0,14	0,19	0,17	0,28	0,37	<LQ	0,42	0,12	<LQ
	C+L	1,61	0,15	0,12	0,82	0,20	<LQ	0,41	0,12	<LQ

GC: Grânulos de cinzas; LC: Lamas compostadas; L+C: Mistura de lamas e cinzas (materiais frescos); LQ: Limite de quantificação; LQ (Pb) = 0,04 mg/kg; LQ (Zn) = 0,08 mg kg⁻¹. **Fonte: Projeto Life No-Waste.**

Num processo de avaliação da remediação de solos contaminados, os parâmetros químicos não são, por si só, suficientes para avaliar a toxicidade do solo, sobretudo porque nem todos os contaminantes presentes estão em concentrações analiticamente detetáveis e apenas a fração biodisponível deste contaminante será tóxica para o organismo e essa toxicidade varia consoante o organismo. Pode também ocorrer interações, sinérgicas ou antagônicas entre os contaminantes e o solo, podendo originar resultados com algumas incertezas. Por estas razões, as estratégias para monitorizar a reabilitação do solo de uma mina devem sempre considerar, em simultâneo, as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

4.3. Influência dos tratamentos nas atividades microbianas dos solos

4.3.1. Influência dos tratamentos na atividade enzimática da desidrogenase

Em geral, a atividade enzimática da desidrogenase é utilizada como um indicador da atividade microbiana global do solo. Segundo os resultados obtidos para a atividade enzimática da desidrogenase nas amostras de solo originais, estas apresentaram diferenças pouco significativas, o que pode indicar que as atividades microbianas iniciais nesses solos são relativamente idênticas, e muito baixas (próximas do limiar de deteção).

De acordo com a Tabela 4.2, as amostras de solos tratadas com C+L foram as que chegaram a atingir valores superiores de atividade enzimática, em T2, o que foi devido à capacidade desses materiais, por serem não estabilizados, manterem uma atividade microbiana mais duradoura. Ao longo do tempo, para T3, essas atividades foram diminuindo, tendo-se mantido acima dos limites de quantificação em alguns dos talhões corrigidos com C+L.

Tabela 4.2 - Atividade enzimática da desidrogenase, nos solos de Aljustrel, Lousal e São Domingos, submetidos aos diferentes tratamentos e nos três tempos de amostragem (valores na matéria seca, média, n=3). Limite de quantificação (LQ) da técnica = 0,38 $\mu\text{G TPF.g ms}^{-1}\text{h}^{-1}$.

TRATAMENTO	TEMPO	DESIDROGENASE ($\mu\text{G TPF.G MS}^{-1}\text{H}^{-1}$)		
		Aljustrel	Lousal	S. Domingos
CONTROLO	T1	<0,38	<0,38	<0,38
	T2	<0,38	<0,38	<0,38
	T3	<0,38	<0,38	<0,38
GC	T1	0,66	0,77	2,02
	T2	<0,38	<0,38	<0,38
	T3	<0,38	<0,38	<0,38
GC + LC	T1	1,06	1,45	1,63
	T2	0,79	<0,38	0,66
	T3	<0,38	<0,38	<0,38
C + L	T1	6,88	5,39	5,54
	T2	11,37	7,74	1,82
	T3	0,75	<0,38	0,42

GC- Grânulos de cinza; LC – Lamas compostadas; C + L - Mistura de cinzas de biomassa + lamas; L – Lamas biológicas.

4.3.2. Avaliação da presença de microrganismos no solo por PCR com primers específicos para fungos e bactérias

4.3.2.1. Avaliação da qualidade e quantidade do DNA do solo

De acordo com estudos anteriores, sabemos que o isolamento de DNA de boa qualidade, sobretudo para aplicação em outras aplicações como amplificação via PCR, continua a ser uma tarefa desafiadora. Segundo Tebb e Vahjen (1993), citados por Tanveer et al. (2016), o solo contém, independentemente da sua fonte, cerca de 0,7 – 3,3 mgml^{-1} de contaminante de ácido húmico e está presente em todos os tipos de solos, desempenhando um importante reservatório de carbono orgânico no solo.

Assim, analisando os resultados obtidos para a extração do DNA, usando o método do Kit DNeasy®PowerSoil® e, segundo as observações de Hermans et al. (2018), os solos das minas em estudo, apresentaram uma elevada concentração de potenciais inibidores

da reação de amplificação via PCR, já que os valores das razões A260 / A230 e A260 / A280 estão fora do intervalo dos valores considerados para DNA suficientemente puro (cerca de 2,0 para a primeira, entre 1,8 e 2,0 para a segunda, respetivamente).

Os valores das razões A260 / A230 obtidos para as amostras analisadas estiveram no intervalo entre 0 e 1,7, valores estes inferiores a 2 (valor médio aceitável). Em relação aos valores das razões A260 / A280, verificou-se que no total de 12 amostras analisadas, apenas duas dessas amostras obtiveram extratos de DNA molde com valor médio dentro da faixa aceitável e ambas pertenceram a amostra de solos tratadas com GC+LC, mas de solos diferentes.

Ainda segundo a Tabela 4.3, os resultados obtidos em amostras de solos usadas como controlo demonstram que estes solos são solos pobres em organismos vivos, uma vez que a concentração de DNA nestes solos são baixas, em comparação com as amostras de solo que foram corrigidas com corretivos orgânicos.

A concentração do DNA nos extratos de DNA variou entre 0,6 e 76,5 ng / μ l, com valores mais altos em extratos de DNA das amostras de solos das minas de Aljustrel e Lousal, e mais precisamente em solos tratados com apenas cinzas de biomassa (GC). Em relação à qualidade dos extratos obtidos a partir dos outros métodos de extração de DNA, verificou-se que os extratos de DNA apresentaram baixa qualidade e rendimento de DNA, com altos níveis de contaminação, sobretudo, pelos ácidos húmicos. Por estas razões, os resultados obtidos a partir do método de protocolo modificado descrito por Porteous e Armstrong (1991), método do protocolo fenol-clorofórmio e método natural, não foram utilizados para a amplificação via PCR.

Tabela 4.3 - Valores das Razões de absorvância para a quantificação de ácido húmico, DNA e proteína, por espectrofotómetro – Método de extração de DNA pelo Kit DNeasy PowerSoil.

Tratamento		Concentração de DNA de solo (ng/µl)	OD 260/230	OD 260/280
Aljustrel	Controlo	1,6	0,2	1,3
	GC	55,7	0,0	0,0
	GC+LC	3,3	0,9	1,8
	C+L	76,5	1,7	1,6
Lousal	Controlo	2,5	0,6	1,4
	GC	56,9	0,0	0,0
	GC+LC	5,5	1,1	1,8
	C+L	5,2	1,0	1,0
São Domingo	Controlo	0,0	0,0	0,0
	GC	29,2	0,0	0,0
	GC+LC	0,6	0,6	0,0
	C+L	0,6	0,7	0,0

Em relação aos resultados das curvas de absorvância obtidas espectrofotometricamente, verificou-se que apenas as amostras cujos extratos apresentaram valores da razão A260 / A280 igual a 1,8, valor médio dentro da faixa aceitável de 1,8 -2, apresentaram curvas de absorvâncias semelhantes às que normalmente se sugere como curvas de absorvância para quando o DNA é suficientemente puro (Figuras 6 e 7).

Utilizar o método espectrofotométrico para quantificar o DNA extraído nem sempre é o procedimento mais confiável, sobretudo quando o extrato tem alguns contaminantes, visto que, por vezes pode ocorrer situações em que pela determinação de um espectrofotómetro não seja notável a presença de DNA, mas ao amplificar o extrato pode haver fragmentos.

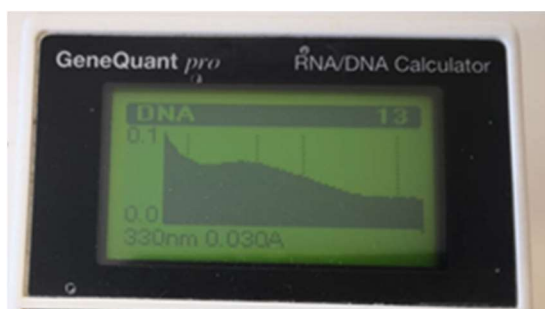


Figura 6 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato de DNA, da amostra de solo das minas de Aljustrel, corrigidas com GC+ LC.

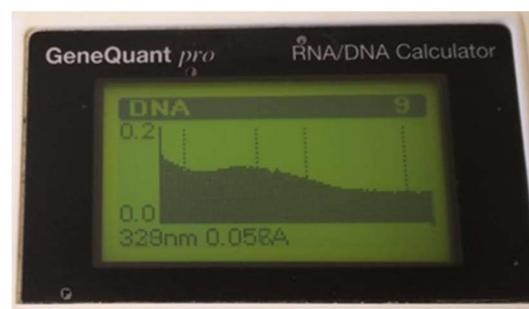


Figura 7 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato de DNA, da amostra de solo das minas de Lousal, corrigidas com GC+LC.

4.3.2.2. Avaliação molecular da presença de DNA bacteriano nos extratos de DNA, por amplificação via PCR

O DNA isolado das amostras de solos em estudo, usando o protocolo do método do Kit DNeasy®PowerSoil®, foi utilizado para amplificação via PCR com primers específicos das bactérias. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese de reação do produto em gel de agarose a 2% (Figura 8).

Ainda que os extratos de DNA isolado tenham apresentado baixa qualidade devido à presença de inibidores da reação de PCR, os resultados da amplificação obtida em gel agarose de 2% demonstraram que houve amplificação para DNA bacteriano, visualizando-se fragmentos de DNA em formas de bandas. A intensidade das bandas variou de amostra para amostra, evidenciando que há presença de DNA de organismos bacterianos em todas as amostras dos solos em estudo, mas em quantidades diferentes. Relativamente aos solos que foram utilizados como controlo, estes apresentaram bandas com pouca intensidade, com fragmentos de 2 200pb a 2 500pb, indicando que a concentração de DNA nas amostras originais são muito baixas. Os extratos de DNA que apresentaram bandas de maiores intensidades, foram, sobretudo, extratos de DNA dos solos das minas de Lousal e São Domingos, sugerindo maior presença de organismos nestas amostras.

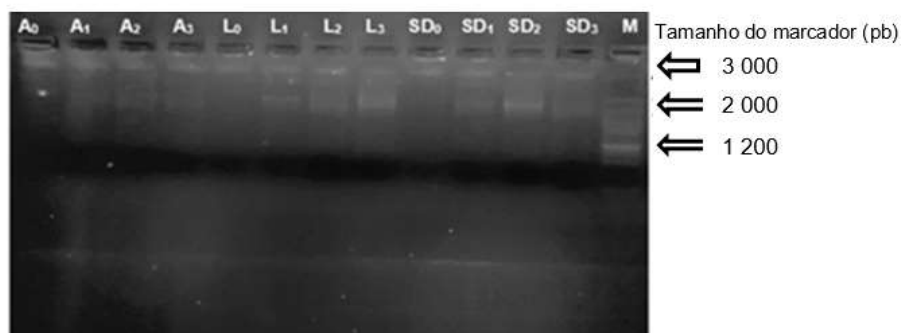


Figura 8 - Perfil de amplificação dos extratos de DNA usando os primers de bactérias (B2TF e V1492R), separados em gel agarose de 2%. As letras A, L e SD, corresponde os iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L), respetivamente. 0 - amostras de solos das minas utilizadas como controlo; M-Marcador 100 pb Ladder Plus.

4.3.2.3. Avaliação molecular da presença de fungos nos extratos de DNA, por amplificação via PCR

Os resultados dos produtos de amplificação por PCR para os fungos foram diferentes dos resultados obtidos para as bactérias, isto é, não se verificou bandas em nenhum dos extratos de DNA (Figura 9). As ausências de bandas em produtos da reação para os fungos, podem ser explicadas, sobretudo, devido à menor abundância relativa (as amostras terem mais DNA de bactérias que de fungos) e à eventual presença de inibidores da reação de amplificação, nomeadamente, ácidos húmicos, proteínas e metais totais.

Conjugando a avaliação dos resultados das reações de amplificação com os resultados obtidos espectrofotometricamente, sugere-se que os extratos de DNA extraídos pelo Kit de extração, para solos contaminados por atividades de uma exploração mineira, são ricos em contaminantes que co-precipitam com o DNA e interferem com as subsequentes reações analíticas, como modificação enzimática do DNA, redução de eficiência da transformação, análise de PCR.

Em geral, são utilizadas substâncias para remover ácidos húmicos e polifenóis, após a extração de DNA. No entanto, o processo de purificação pode comprometer o rendimento e a qualidade do DNA extraído (Hermans et al., 2018).



Figura 9 - Perfil de amplificação dos extratos de DNA usando os primers de fungos (ITS1F e ITS4R), separados em gel agarose de 2%. As letras A, L e SD, corresponde os iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L), respetivamente. 0 - amostras de solos das minas utilizadas como controlo; M-Marcador 100 pb Ladder Plus.

4.3.3. Influência dos tratamentos no crescimento dos microrganismos do solo (bactérias e fungos) - Plaqueamento com contagem de colónias

O número de bactérias e fungos nas amostras de solos estudadas foram analisadas pelo método de contagem de colónias nas placas. Os microrganismos foram cultivados em meios de gelatina, DifcoTM Potato – Dextrose Agar. Os ensaios foram realizados utilizando duas quantidades diferentes de extratos, nomeadamente 10 µl e 100 µl, de modo a analisar o gradiente de crescimento. Todos os resultados apresentados foram expressos em unidades de colónias.

4.3.3.1. Placas com culturas LB – Contagem de Bactérias

Os maiores números de colónias de bactérias foram observados em solos tratados com cinzas de biomassa e lamas celulósicas, não estabilizados pelo método de granulometria ou compostagem (Tabela 4.4). De entre os agentes auxiliares da fitorremediação utilizados para a remediação dos solos em estudos, as cinzas de biomassa foram os que apresentaram efeitos menos favoráveis no crescimento de bactérias, realçando, assim, um dos efeitos da utilização das lamas celulósicas e a combinação desta com as cinzas de biomassa.

Tabela 4.4 - Contagem de número de colónias de bactérias

	Controlo		GC		GC + CL		C + L	
	10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl
Aljustrel	0	0	1	17	92	245	51	247
Lousal	0	1	30	35	70	152	67	186
São Domingos	0	1	5	44	176	132	43	132

GC- Grânulos de cinza; LC – Lamas compostadas; C + L - Mistura de cinzas de biomassa+ lamas; L – Lamas biológicas.

Segundo os resultados da Tabela 4.4, as amostras de solos das minas de Aljustrel, apresentaram globalmente uma maior carga de colónias bacterianas, apesar de não haver crescimento de bactérias em placas de controlo, ao contrário do que se verificou nos solos das outras duas minas. A carga microbiana aumentou consoante o tipo de tratamento. Comparando o número de colónias crescidas nas diferentes placas com meio LB, verificou-se um aumento gradual da carga microbiana de solos tratados com

apenas cinzas de biomassa a solos com tratamento de resíduos de cinzas de biomassa e lamas celulósicas, sendo estes estabilizados e não estabilizados. Em relação a quantidade de extratos utilizado nos ensaios, verificou-se que quase todas as amostras apresentaram um gradiente de crescimento positivo, indicando menor número de colónias nas placas com 10 µl de extrato em comparação com as placas com 100µl de extrato, fruto do efeito da diluição e não da contaminação do ar. O que quer dizer que o número de colónias variou consoante a quantidade de extratos, ou seja, quanto maior o volume do extrato adicionado no meio de cultura LB, maior foi a carga microbiana. De modo geral, a aplicação de todos os agentes auxiliares do processo da fitorremediação de solo afetaram significativamente o crescimento de bactérias.

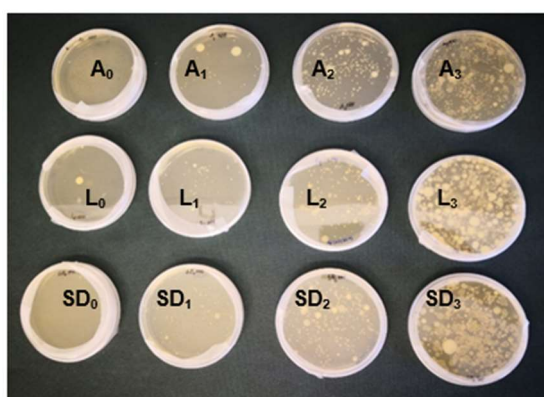


Figura 4.7 - Placas com as colónias de bactérias, 100 µl de extrato de solos.

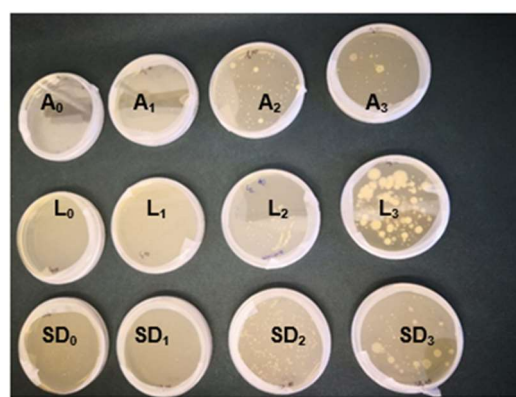


Figura 4.8 - Placas com as colónias de bactérias, 10 µl de extrato de solos¹

4.3.3.2. Placas com culturas PDA – contagem de fungos

O efeito da aplicação de grânulos de cinzas de biomassa e lamas celulósicas estabilizadas no crescimento de fungos não foi tão visivelmente eficaz quanto nas bactérias (Tabela 4.4). Uma das opções mais benéfica segundo os resultados obtidos foi aquando da aplicação de resíduos de cinzas de biomassa e lamas celulósicas, não estabilizadas ou compostadas.

Os resultados da tabela 4.4 demonstraram ainda que, para as mesmas diluições de solo, as placas PDA para o crescimento de colónias de fungos, apresentaram um menor número de colónias de fungos quando comparados com o número de colónias de bactérias, nas placas LB. Este resultado pode ser devido ao facto dos fungos serem microrganismos de crescimento lento, o que indica que necessitam de um intervalo de

tempo maior para o seu desenvolvimento. Contudo, as amostras de solos originais, ou seja, controlo, apresentaram uma maior carga de fungos que de bactérias. Repetições desta experiência permitiriam clarificar este aspecto.

Tabela 4.5 - Contagem de número de colónias de fungos

	Controlo		GC		GC + CL		C + L	
	10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl
Aljustrel	0	10	0	17	0	0	0	30
Lousal	0	2	0	2	0	6	4	12
São Domingos	1	12	1	10	0	8	4	20

GC - Grânulos de cinza; LC - Lamas compostadas; C + L - Mistura de cinzas de biomassa + lamas; L – Lamas biológicas.

Os maiores valores observados foram em solos das minas de Aljustrel e São Domingos, onde por sua vez se observou uma grande carga fúngica em placas com apenas solos das respetivas minas, isto é, sem qualquer tipo de tratamento. No caso dos fungos, notou-se a influência da estabilização dos resíduos sobre o seu crescimento, pelo que as placas onde os solos foram tratados com grânulos de cinzas de biomassa e lamas celulósicas já estabilizadas não se observou presenças significativas de microrganismos fúngicos.

Em placas com apenas 10 µl de extratos, o solo das minas de São Domingos demonstrou ser, mais uma vez, o solo com propriedades que mais facilitam o crescimento deste tipo de microrganismos, isto em comparação com os outros solos em estudo. Estes resultados apontam para um gradiente de crescimento também positivo, verificada em todas as placas, no entanto este efeito foi menos claro que no caso das bactérias. Ainda que as informações que se obtém na determinação da comunidade de microrganismos do solo através do método de cultura sejam valiosos para o estudo da diversidade de microrganismos do solo, estes resultados não refletem completamente o estado real da população de microrganismos do solo, visto que há fatores que condicionam os seus crescimentos.

Estes fatores podem estar relacionados com o próprio meio de cultura utilizado, as condições ambientais, o tempo de incubação e/ou de crescimento e entre vários outros fatores. Há ainda hipótese de haver no solo fungos que não cresçam em meio de cultura, e que ficaram, por isso, naturalmente sub-representados numa abordagem como esta.

As vantagens desta técnica são que são preparações fáceis de serem executadas, sendo um método rápido, barato e com formação de colônias bem separadas, que permite a sua purificação e caracterização de uma forma mais adequada. Assim, por esta razão, é aconselhável a aplicação deste método em conjunto com a determinação de outros parâmetros que definem as propriedades do solo, como por exemplo, propriedades bioquímicas, físico-químicas e/ou atividades enzimáticas, como complementares.

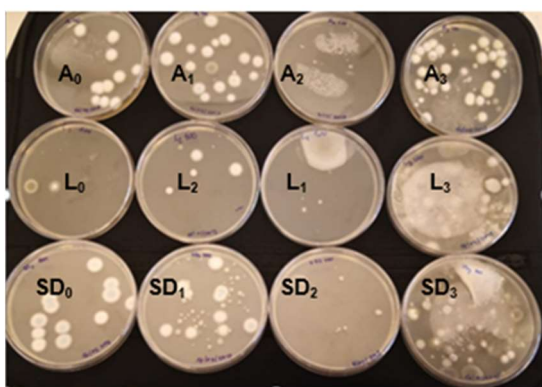


Figura 4.9 - Placas com as colônias fúngicas, 100 µl extrato de solos.

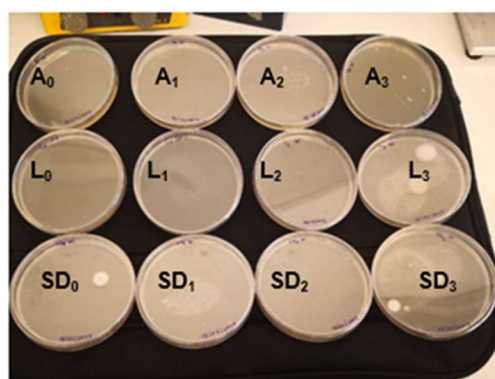


Figura 5 - Placas com as colônias fúngicas, 10 µl extrato de solos.

4.4. Relação entre os resultados para os parâmetros físico-químicos, os teores em metais extraíveis e as atividades microbianas

A toxicidade dos metais pesados para os microrganismos do solo depende fortemente disponibilidade desses poluentes, no qual esta é afetada por vários parâmetros do solo, principalmente pH, textura do solo, teor de matéria orgânica, concentração de óxidos de ferro. Para este estudo, as amostras de solos das minas de São Domingos, que apresentaram maior concentração em metais pesados biodisponíveis, foram as mesmas amostras que em termos de número de crescimento de colônias foram as que apresentaram carga de microrganismos mais baixas, para ambos os microrganismos.

5. Conclusão

A utilização de resíduos para a remediação de solos degradados por atividades mineiras constitui uma estratégia importante para a melhoria da sua qualidade, promovendo, em simultâneo, a valorização desses resíduos, reforçando as políticas de sustentabilidade ambiental.

Os resultados revelaram que a aplicação das cinzas de biomassa e das lamas biológicas (na forma de grânulos de cinzas + lamas compostadas ou como materiais frescos) permitiram melhorar as propriedades físico-químicas dos solos, corrigindo a sua acidez para valores de pH entre 7- 8, e aumentando o teor de matéria orgânica e de nutrientes essenciais (N, P e K). A aplicação de grânulos de cinzas também permitiu a correção da acidez dos solos das minas, mas não permitiram um aumento tão acentuado no teor em nutrientes essenciais, o que não permitirá, só por si, uma melhoria considerável da fertilidade desses solos.

A correção da acidez alcançada por incorporação de todos os corretivos, permitiu uma diminuição da extratibilidade dos metais (Cu, Pb e Zn), o que se repercutirá numa diminuição da sua biodisponibilidade. A incorporação dos materiais frescos (C+L) permitiu, de uma maneira geral, e relativamente aos parâmetros físico-químicos, os melhores resultados de MO e nutrientes essenciais, mas foram também aqueles onde o aumento da salinidade (CE) foi maior, o que pode ser um constrangimento ao posterior estabelecimento de um coberto vegetal.

Os resultados mostraram que, a melhoria das propriedades físico-químicas do solo e a redução da extratibilidade dos metais, afetaram significativamente a comunidade microbiana, com aumentos da sua atividade. Tanto a avaliação da carga microbiana através de plaqueamento, como a avaliação molecular, foram importantes para a caracterização da atividade microbiana nas diferentes amostras de solos. As duas técnicas utilizadas para avaliar a atividade microbiológica dos solos, apresentaram resultados com uma certa concordância, caracterizando os solos das três minas em estudo, como sendo solos com baixa atividade microbiana. Os resultados do plaqueamento revelaram os efeitos dos tratamentos dos solos, destacando sobretudo o solo da mina de São Domingos por ter apresentado números de crescimento de colónias mais baixas e, a mina de Aljustrel por apresentar melhorias mais acentuadas, devido aos tratamentos.

Os resultados da avaliação molecular demonstraram que para o mesmo tipo de amostras de solos, diferentes quantidades e qualidades de DNA, podem ser obtidas

utilizando diferentes métodos de extração. De facto, os microrganismos do solo apresentam diferentes suscetibilidades a diferentes procedimentos de extração, devido às suas características intrínsecas. Os resultados demonstraram ainda que, apesar do isolamento do DNA ser possível, este não é muito fácil, condicionando o sucesso dos processos de amplificação via PCR, devido à presença de ácidos húmicos e outros inibidores enzimáticos que podem ser extraídos no processo de extração de DNA. Ao analisar os resultados de extração de DNA obtidos a partir do Kit de extração, verificou-se que todas as amostras de DNA apresentaram diferentes níveis de pureza, para o mesmo tipo de amostras.

A partir dos resultados deste estudo, ficou evidente a necessidade de haver um estudo antecipado dos métodos de extração de modo a estabelecer o método de extração que melhor se adequa a cada tipo de amostras de solos que se quer estudar. Quando se executa a extração do DNA, é aconselhável um especial cuidado, respeitando todas as etapas e instruções do protocolo, de modo a obter melhores resultados.

Dos quatros métodos de extração de DNA utilizado neste estudo, o método mais eficiente para o tipo de amostras de solos (solo poluído), com alto teor de ácido húmico, foi o método de Kit DNeasy®PowerSoil®. No entanto, devido ao elevado grau de inibição de amplificação por PCR, os fragmentos de DNA foram submetidos a purificação, mas sem melhorias notáveis.

6. Referências bibliográficas

Abreu, M., Santos, E.S., M.C.F. Magalhães, Nabais, C. 2009. Arsenic containing phases in soils from São Domingos mining area and in non-contaminated soils from Pomarão and Serra do Caldeirão.

Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A., Baião, N., Fernandes, R., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Queda, A. 2008. Assessment of chemical, biochemical and ecotoxicological aspects in a mine soil amended with sludge of either urban or industrial origin. *Chemosphere* 72, pp 1774–1781.

Alvarenga, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Cunha-Queda, A.C. 2008a. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Science of The Total Environment* 406, pp 43–56.

Alvarenga, P., Gonçalves, A., Fernandes, R., Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Queda, A. 2008 b. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. pp. 6-9. Alvarenga, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E.,

Alvarenga, P. 2009. Utilização de resíduos orgânicos biodegradáveis na remediação de solos degradados por actividades mineiras. Tese de Doutoramento em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.

Alvarenga, P., Fernandes, R., Varennes, A., Vallii, G., Duarte, E., Queda, A. 2011. Assisted phytostabilization of soils affected by mining activities using *lolium perenne* L. *Revista de Ciências Agrárias. Vol.34.* pp 117-130.

Alvarenga, P. 2015. Phytoremediation as a soil remediation technology. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Universidade Politécnica de Valência, Valência, Espanha.

Alvarenga, P., Rodrigues, D., Mourinha, C., Palma, P., Varennes, A., Cruz, N., Tarelho, L., Rodrigues, S. 2019. Use of waste from the pulp and paper industry in the recovery of waste degraded by mining activities: chemical, biochemical and ecotoxicological effects. *Science of the Total Environment. Vol. 686.* pp 1152-1163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.038>.

-
- Ananbeh, H., Stojanovic, M., Pompeiano, A., Voberková, S., Trasar-Cepeda, C. 2019.** Use of Soil enzyme activities to assess the recovery of soil functions in abandoned coppice forest systems. *Science of The Total Environment*. Vol. 694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133692> .
- Barros, E., Meneghine, A., Bagatini, I., Fernandes, C., Kishi, L., Vieira, A., Sarmiento, H. 2019.** Comparison of two DNA extraction methods widely used in aquatic microbial ecology. *Journal of Microbiological Methods* 159(2019), pp 12-17. www.elsevier.com/locate/jmicmeth .
- Brännvall, E., Wolters, M., Sjöblom, R., Kumpiene, J. 2015.** Elements availability in soil fertilized with pelletized fly ash and biosolids. *Journal of Environmental Management* 159, pp 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.032> .
- Bremner, J. 1960.** Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55(1), pp11-33.
- Brookes, P. C., Cayuela, M. L., Contin, M., De Nobili, M., Kemmitt, S. J. Mondini, C. 2008.** The mineralisation of fresh and humified soil organic matter by the soil microbial biomass. *Waste Management*. Vol. 28, pp. 716–722.
- Bui, X.-T., Fujioka, T., Chiemchaisri, C., Varjani, S. 2019.** Water and Wastewater Treatment Technologies. Energy, Environment, and Sustainability. ISBN 978-981-13-3258-6 ISBN 978-981-13-3259-3 (eBook). pp 528. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3> .
- Cabral, F., Vasconcelos, E. 1993.** The use as fertilizer of combined primary/secondary pulp-mill sludge. In: Frago, M.A.C., van Beusichem, M.L. (Eds.). *Optimization of Plant Nutrition*, 77-81. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Castro, A.p., Marques, M.M., Coelho, J.M., Neto, M.C. 2005.** “O Solo – Factor de Qualidade Ambiental”. *Revista de Ciências Agrárias*. Vol. XXVII. Nº 2.
- Canção, J., Shen, Q., Wang, L., Qiu, G., Shi, G., Xu, J., C. Brookes, P., Liu, X. 2018.** Effects of Cd, Cu, Zn and their combined action on microbial biomass and bacterial community structure. *Environmental Pollution*. Vol. 243. pp 510-518. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.011>.
- Chander, K., Brookes, P. C. 1991.** Is the dehydrogenase activity invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils? *Soil Biology & Biochemistry* 23, pp 909-915.

Cheng, F., Hou, L., Woeste, K., Shang, Z., Peng, X., Zhao, P., Zhang, S. 2016. Soil pretreatment and fast cell lysis for direct polymerase chain reaction from forest soils for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal communities. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 47. pp 817-827.

Cordeiro, M. 2017. Caracterização ambiental do complexo mineiro de São Domingos – cartografia de infraestruturas e impacto sobre o meio hídrico. Universidade do Minho. pp 104.

Cruz, N.C., Rodrigues, S.M., Carvalho, L., Duarte, A.C., Pereira, E., Romkens, P.F.A.M., Tarelho, A.L.C. 2017. Combustion ash in the fluidized bed of forest residual biomass: soil recycling as a viable management option. Vol. 24. pp 14770-14781.

Dai, Z., Webster, T., Enders, A., Hanley, K., Jianming Xu, Thies, J., Lehmann. 2017. DNA extraction efficiency from soil as affected by pyrolysis temperature and extractable organic carbon of high-ash biochar. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 225. pp 129-136.

De Varennes, A. 2003. Produtividade dos Solos e Ambiente. Escolar Editora. Lisboa.

Dineshkumar, M., Seenuvasan, M., Sarojini, G., 2018. Phytoremediation Strategies on Heavy Metal Removal. *Water and Wastewater Treatment*. pp 81-101.

Domingos, H., Serrão, M.G., Martins, J.C., Castelo-Branco, M.A., Monteiro, O.R., Fernandes, M.L., Pires, F., Campos, A.M., Horta, C., Salgueiro, A., Dordio, A. 2003. Copper concentrations in surface runoff water in a soil to which a copper rich urban biosolids was applied. pp 14.

Favas, P., Pratas, J., Chaturvedi, R., Paulo, M.S., Prasad, M.N.V. 2016. Chapter 10 - Tree Cultures in Abandoned Mines for Environmental Remediation and Industrial Raw Material. *Bioremediation and Bioeconomics*. pp 219-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802830-8.00010-1>.

Ferreira, C.B. 2016. Estudo da utilização de lamas residuais do tratamento de águas para consumo humano na fitoestabilização de solos afetados por atividades mineiras. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Instituto Politécnico de Beja.

Hamedi, J., Danaiefar, M., Moghimi, H. 2016. Rapid and efficient method for environmental DNA extraction and purification from soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. doi: 10.15414/jmbfs.2016.5.6.530-533 .

Hermans, Syrie M., Buckley, H. e Lear, G. 2018. Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types. *WILEY. Molecular Ecology Resources*. DOI: 10.1111/1755-0998.12762.

Högfors-Rönnholm, E., Christel, S., Engblom, S., Dopson, M. 2018. Indirect DNA extraction method suitable for acidic soil with high clay content. *MethodsX. Vol.5.* pp 136-140. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.02.005>.

Huang, D., Yan, G., Gudmestad, N., Skantar, A. 2017. Quantification of *Paratrichodorus allius* in DNA extracted from soil using TaqMan Probe and SYBR Green real-time PCR assays. *Nematology*. pp 987-1001.

LQARS., INIAV- Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva. 2006. Manual de fertilização das culturas. Tapada da Ajuda : s.n., 2006. Apartado 3228-1301-903.

ISO 11466:1995 – Soil quality – Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organisation for Standardisation.

ISO 23753-1. 2002. Draft (Enquiry Stage). Soil quality - Determination of dehydrogenase activity in soils- Part 1: Method with TTC. International Organisation for Standardisation. Genève, Switzerland.

Joniec, J., Furczak, J., Kwiatkowska, E. 2015. Application of Biological Indicators for Estimation of Remediation of Soil Degraded by Sulphur Industry. *Ecol Chem Eng S.* 2015; 22(2):269-283.

Lenart-Boro, A., Boro, P. 2014. The Effect of Industrial Heavy Metal Pollution on Microbial Abundance and Diversity in Soils — A Review, in: Hernandez Soriano, M.C. (Ed.), *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57406>.

Liu, L., Li, W., Song, W., Guo, M. 2018. Remediation Techniques for Heavy Metal Contaminated Soils: Principles and Applicability. *Science of the Total Environment. Vol. 633.* 206-219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>.

Lupwayi, N., May, W., Kanashiro, D., Petri, R. 2018. Soil bacterial community responses to black medic cover crop and fertilizer N under no-till. *Applied Soil Ecology* 124(2018). pp 95 -103.

Mao, C. Song, Y., Chen, L., Ji J., Li, J., Yuan, Yang Z., Ayoko, G., Frost, R., Theiss, F. 2019. Human health risks of heavy metals in paddy rice based on transfer characteristics of heavy metals from soil to rice. *CATENA. Vol. 175.* 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.12.029>.

Matos, J.X., Martins, L.P. 2006. Reabilitação ambiental de áreas mineiras do sector português da Faixa Piritosa Ibérica: estado da arte e perspectivas futuras. *Boletim Geológico e Mineiro*. 117(2): 289-304.

Matos, J.X., Oliveira, V. 2003 - Mina do Lousal (Faixa Piritosa Ibérica) - Percorso geológico e mineiro pelas cortas e galerias da antiga mina. IGME, Pub. Museo Geominero, nº2, Espanha, pp 117-128.

Miguel, A. 2007. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Biológica do Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.

Min, Y., Toyota, K., Sato, E. 2012. A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology*. Vol. 14(3). pp 265-273.

Nurmesniemi, H., Mäkelä, M., Pöykiö, R., Manskinen, K., Dahl, O. 2012. Comparison of the forest fertilizer properties of ash fractions from two power plants of pulp and paper mills incinerating biomass-based fuels. *Fuel Processing Technology* 104, pp 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.06.012> .

Niemien, M., Piirainen, S., Moilanen, M. 2007. Release of mineral nutrients and heavy metals from wood and peat ash fertilizers: Field studies in Finnish forest soils. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 20:2, pp 146-153, DOI: 10.1080/02827580510008293.

Oliveira, J. M. S. 1997. "Algumas reflexões com enfoque na problemática dos riscos ambientais associados à actividade mineira." Estudos, Notas e Trabalho - Instituto Geológico e Mineiro (IGM) 39: 3-25.

Oliveira, J. M. S., J. Farinha, J. X. Matos, P. Ávila, C. Rosa, M. J. C. Machado, F. S. Daniel, L. Martins and M. R. M. Leite. 2002. "Diagnóstico Ambiental das Principais Áreas Mineiras Degradadas do País." *Boletim de Minas - Instituto Geológico e Mineiro (IGM)* 39(2): 67-85.

Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., Montanarella, L., 2013. Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health* 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/158764>.

Pardo, T., Clemente, R., Alvarenga, P., Bernal, M.P. 2014. Efficiency of organic and inorganic soil changes in remediation of a mine contaminated soil: II. Biological and ecotoxicological assessment. *Chemosphere*. Vol. 107. pp 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.017> .

Pesonen, J., Kuokkanen, V., Kuokkanen, T., Illikainen, M. 2016. Co-granulation of bio-ash with sewage sludge and lime for fertilizer use. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4, pp 4817–4821. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.12.035> .

Ram, L.C., Masto, R.E. 2014. Fly ash for soil improvement: a review on the influence of ash mixing with inorganic and organic agendas. *Earth of Science Reviews*. Vol. 128. pp 52-74. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2013.10.003>.

Riehm, H. 1958. Die ammoniumlaktatessigsäure-methode zur bestimmung der leichtlöslichen phosphorsäure in karbonathaltigen boden. *Agrochimica* 3: 49-65 (in German).

Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M. 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*. Vol. 18. pp 47-60. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00149-4).

Rodrigues, D. 2017. Estudo da utilização de cinzas de biomassa e resíduos orgânicos na fitoestabilização assistida de solos afetados por atividades mineiras. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente no Instituto Politécnico de Beja – Escola Superior Agrária.

Ruppert, K., J. Kline, R., Rahman, Md. 2019. Past, present and future perspectives on environmental DNA metabolism (eDNA): a systematic review on methods, monitoring and applications of global Edna. *Global Ecology and conservation*. Vol. 17. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>.

Sagar, K., Singh, Singh, S., Goutam, K., Konwar, B. 2014. Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. *Journal of Microbiological Methods*. pp 68-73.

Santos, J.Q. 1996. Fertilização – Fundamentos da Utilização dos Adubos e Correctivos. 2ª Edição. Publicações Europa-América.

Santos, J. Q. 2015. Fertilização - Fundamentos Agroambientais da Utilização dos Adubos e Corretivos. Porto, Portugal: PubIndústria.PP.556. ISBN: 9789897230851.

Saarsalmi, A., Smolander, A., Kukkola, M., Moilanen, M., Saramäki, J. 2012. 30-Year effects of wood ash and nitrogen fertilization on soil chemical properties, soil microbial processes and stand growth in a Scots pine stand. *Forest Ecology and Management* 278, pp 63–70. [https:// doi.org/10.1016/j.foreco.2012.05.006](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.05.006) .

Satyanarayana, S., Krishna, M., Kumar, P. 2017. Optimization of high-yielding protocol for DNA extraction from the forest rhizosphere microbes. *Cross Mark*. pp 10. DOI 10.1007/s13205-017-0737-2.

Sharma, S., Sharma, K.K., kudad, R.C. 2013. An efficient and economical method for extraction of DNA amenable to biotechnological manipulations, from diverse soils and sediments. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. pp 11.

Stemmer, M., Watzinger, A., Blochberger, K., Haberhauer, G., Gerzabek, M. 2007. Binding dynamics of soil microbial phospholipid fatty acids to carbon mineralization ¹³C Natural Abundance Experiment: Heavy Metal Impact and Acid Rain. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 39. pp 3177-3186.

Tabatabai, M. A. 1982. Soil Enzymes. In Page, A. L., Baker, D. E., Rosco, E., Ellis, J., Keeney, D. R., Miller, R. H. & J. D. Rhoades (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 2, chemical and microbiological properties*, (2nd ed.) (903-943). Madison: American Society of Agronomy, Inc. e Soil Science Society of America.

Tanase, A, Mereuta, I., Chiciuden, I., Ionescu, R., Milea, L., Cornea, C., vassu, T., Stoica, I. 2015. Comparison of Total DNA Extraction Methods for Microbial Community form Polluted Soil. *Agriculture and Agricultural Science, Procedia*. pp 616-622.

Tanveer, A., Yadav, S., Yadav, D. 2016. Comparative assessment of methods for metagenomic DNA isolation from soils of different crop growing fields. *Biotech (2016)* 6:220. DOI 10.1007/s13205-016-0543-2.

Tarelho LAC., Teixeira ER., Silva DFR., Modolo RCE., Lanbrincha JA., Rocha, EJFT. 2015. Characteristics of distinct ash flows in a biomass thermal power plant with bubbling fluidized bed combustor. *Energy* 90: pp 387-402.

Truu, M. 2008. Impact of land use on microbial communities in Estonian Soil. *Dissertationes Technologiae Circumiectorium Universitas Tartuensis*. pp 57.

Venkatachalam, P., Jayalakshmi, N., Geetha, N., V. Sahi, S., C. Sharma, N., R. Rene, E., K. Sarkar, S., J.C. Favas, P. 2017. Accumulation efficiency, genotoxicity and antioxidant defense mechanisms in medicinal plant *Acalypha indica*. Under lead stress.

Verma, S., Singh, H., Sharma, P. 2017. An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. *CrossMark*. pp 8. DOI 10.1007/s13205-017-0847-x.

Walkley, A., Black, J.A. 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, pp 29-38.

Wei, Z., Hao, Z. Li, X., Guan, Z., Cai, Y., Lion, X. 2019. The effects of phytoremediation on soil bacterial communities in an abandoned mine site of rare earth elements. *Science of the Total Environment* 670 (2019) pp 950-960.

Williamson, A., Johnson, M.S. (1981). Reclamation of metalliferous mine wastes. In N.W. Lepp (Ed.), *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants*, Vol. 2. Metals in the Environment. pp. 185-212. Barking: Applied Science Publishers Ltd.

Wuana, R.A., Okieimen, F.E. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology* 2011, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>.

Wu, Z., Gao, G., Wang, Y. 2019. Effects of soil properties, heavy metals and PBDEs on the microbial community of e-waste contaminated soil. *Ecotoxicology Environment Safety*. Vol. 180. pp 705-714. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.027>.

Ye, Z. H., Shu, W. S., Zhang, Z. Q., Lan, C. Y., and Wong, M. H. 2002. Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques. *Chemosphere* 47, pp 1103-1111.

Zielinska, S., Radkowski, P., Blendowska, A., Ludwing-Galezowska, A., M.Los, J., Los, M. 2016. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. *MicrobiologyOpen*. pp 11. DOI:10.1002/mbo3.453.

Zhao, X., Huang, J., Lu, J., Sun, L. 2019. Study of the influence of the soil microbial community on long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 170. pp 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.136>.

6.1. Bibliografia Eletrónica

CCME, 2006. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Informação acedida em: <http://st-ts.ccme.ca/>. Acedido no dia 09/01/2020.

FAO e ITPS. 2015. Internacional Year of Soils 2015. **Food and Agriculture Organization of the United Nations e Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.** Informação acedida em: <http://www.fao.org/3/a-bc608e.pdf>. Acedido no dia 20/10/2019.

7. Anexos

7.1. Anexo A: Protocolo de Extração de DNA - Kit DNeasy®PowerSoil®

De acordo com as instruções e recomendações do manual de utilização do Kit **DNeasy®PowerSoil®**, o isolamento de DNA procedeu-se do modo que seguidamente se apresenta, realçando apenas, que o Kit de extração utilizado era constituído por 6 soluções, com designação de C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ e C₆, tubos de 2 ml vazios, tubos de PowerBead e colunas MB Spincolumn. Após a secagem, moenda e trituração com azoto líquido, mediu-se 250 mg de cada amostra de solo e adicionou-se aos tubos PowerBead. De seguida a mistura foi homogeneizada num agitador de vortex e posteriormente adicionou-se 60 µl de solução C₁, agitando novamente no vortex durante 10 min e centrifugou-se a 10 000g por durante 30s. Após a centrifugação, o sobrenadante é retirado para um tubo de 2 ml, ao qual se adiciona 250 µl de solução C₂. A nova mistura é agitada por durante 5 s, seguido para a incubação de 5 min a uma temperatura a variar entre 2 a 8 °C (Frigorífico). A seguir a incubação procedeu-se a centrifugação por durante 1 min a 10 000xg, no qual cerca de 600 µl de sobrenadante foi transferidos para um novo tubo de recolha (tubo de 2 ml), onde se adicionou-se 200 µl de solução C₃. Agitou-se em vortex e encaminhou-se novamente para a incubação, a uma temperatura entre 2 a 8°C (frigorífico) por 5 min, e centrifugou-se durante 1 min a 10 000g.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado para um outro tubo de recolha ao qual se adicionou-se 1200 µl de solução C₄. A mistura foi homogeneizada num vortex durante 5 s, onde 675 µl deste é carregado seguidamente para uma coluna de separação MB Spincolumn, aonde o DNA é retido. Esta coluna é centrifugada durante 1 min a 10 000xg para eliminar o excesso da fase líquida. Repetiu-se este passo duas vezes, até que toda a amostra fosse processada.

De seguida, a coluna com o DNA retido foi submetido a uma lavagem , ao qual se adicionou 500 µl de solução C₅ à coluna já adicionado num tubo de recolha (tubo de 2 ml). Centrifugou-se por durante 30 s a 10 000g, eliminando a fase líquida e, em seguida, centrifugou-se novamente durante 1 min a 10 000g, permitindo a eliminação completa de tudo o que esteja retido na coluna após lavagem do DNA. Por último, a coluna MB com DNA foi cuidadosamente transferido para um tubo de 2 ml, no qual se adicionou 100 µl de solução C₆ (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) para o centro da membrana, no filtro branco. Procedeu-se a centrifugação por 20 s a 10 000xg e por fim, recolheu-se a solução C₆, aonde o DNA foi transferido e posteriormente armazenado no congelador.

7.2. Anexo B – Imagem do espectrofotómetro com as curvas de absorvância de 230 a 320 nm, dos extratos das amostras de solos das minas de Aljustrel.



Figura 10 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Aljustrel; A₀ - Controlo.

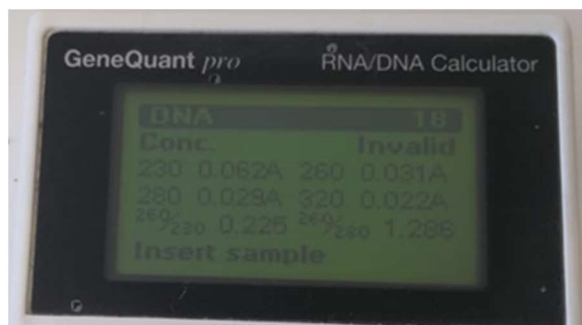


Figura 10.1 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Aljustrel; A₀ - Controlo.



Figura 10.2 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Aljustrel; A₁ - Solos tratados com cinzas de biomassa.

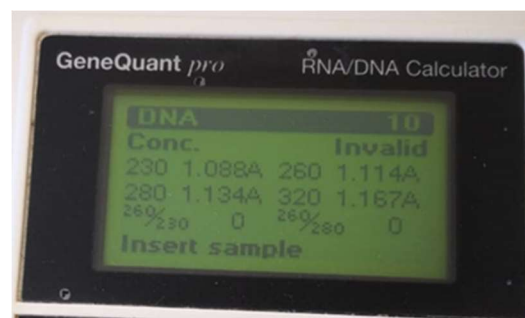


Figura 10.3 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Aljustrel; A₁ - Solos tratados com cinzas de biomassa.

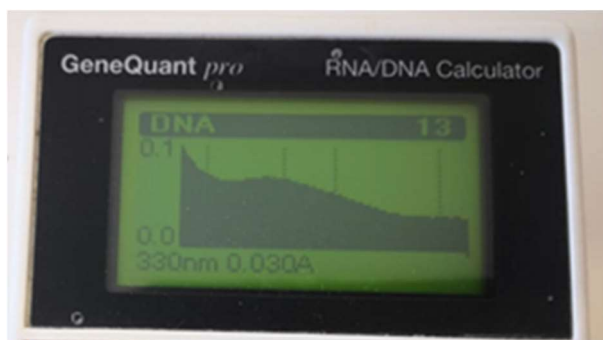


Figura 10.4 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Aljustrel; A₂ - Solos tratados com cinzas de biomassa granuladas e lamas celulósicas estabilizadas.



Figura 10.5 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Aljustrel; A₂ - Solos tratados com cinzas de biomassa granuladas e lamas celulósicas estabilizadas.

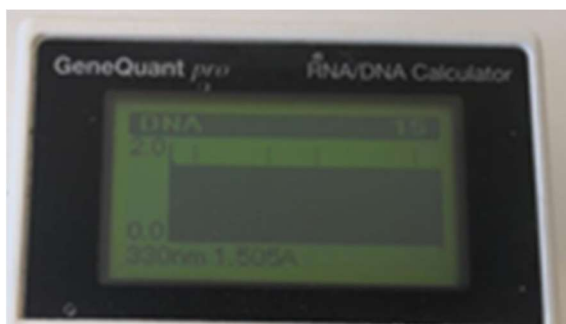


Figura 10.6 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Aljustrel; A₃ - Solos tratados com cinzas de biomassa e lamas celulósicas não granuladas ou estabilizadas.

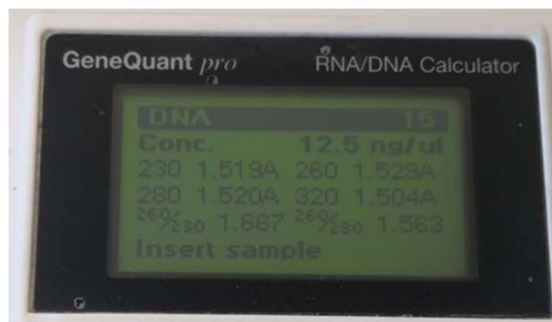


Figura 10.7 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Aljustrel; A₃ - Solos tratados com cinzas de biomassa e lamas celulósicas não granuladas ou estabilizadas.

7.3. Anexo B – Imagem do espectrofotómetro com as curvas de absorvância de 230 a 320 nm, dos extratos das amostras de solos das minas de Lousal.

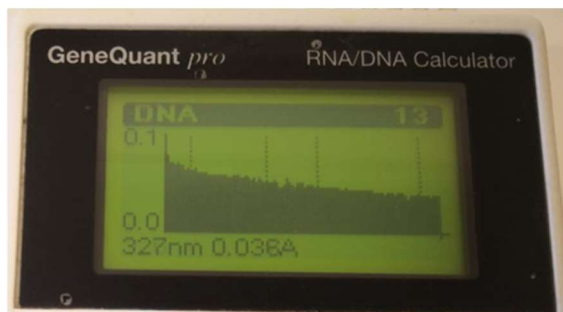


Figura 10.8 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Lousal; L₀ – Controlo.

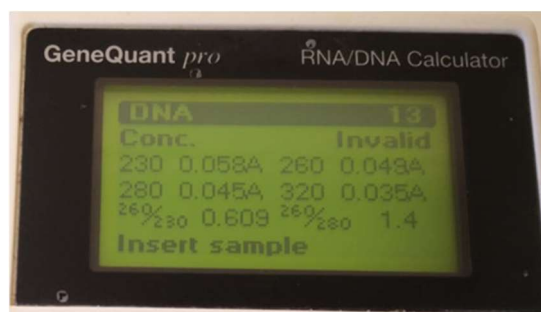


Figura 10.9 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Lousal; L₀ – Controlo.

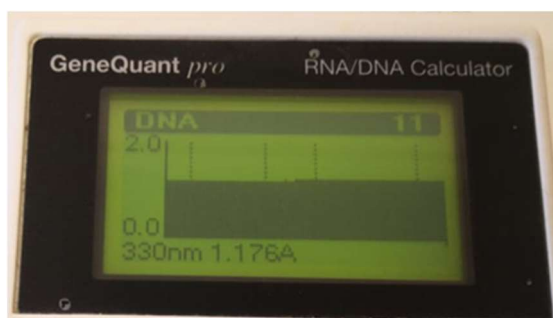


Figura 10.10 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Lousal; L₁ - Solos tratados com cinzas de biomassa.

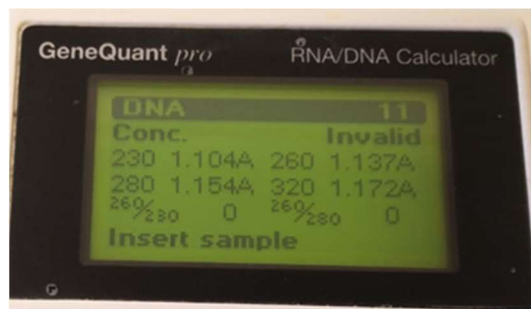


Figura 10.11 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Lousal; L₁ – Solos tratados com cinzas de biomassa.

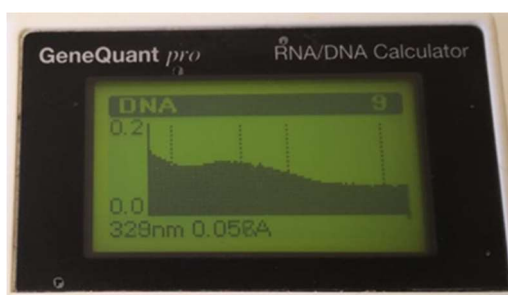


Figura 10.12 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Lousal; L₂ - Solos tratados com cinzas de biomassa granuladas e lamas celulósicas estabilizadas.

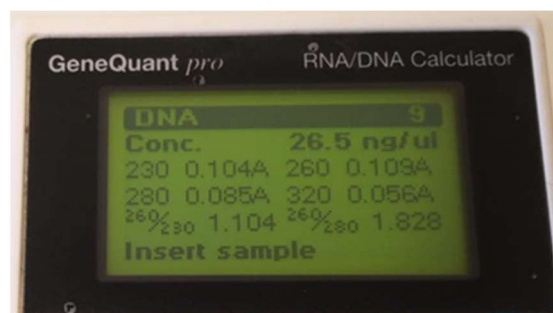


Figura 10.13 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Lousal; L₂ - Solos tratados com cinzas de biomassa granuladas e lamas celulósicas estabilizadas.



Figura 10.14 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de Lousal; L₃ - Solos tratados com cinzas de biomassa e lamas celulósicas não granuladas ou estabilizadas.

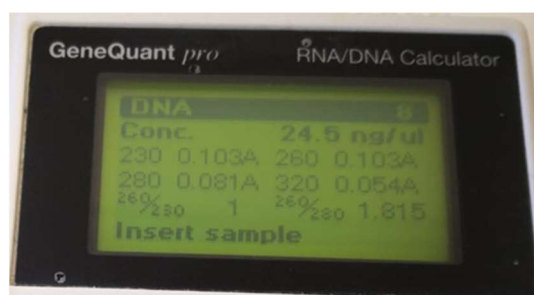


Figura 10.15 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Lousal; L₃ - Solos tratados com cinzas de biomassa e lamas celulósicas não granuladas ou

7.4. Anexo B – Imagem do espectrofotómetro com as curvas de absorvância de 230 a 320 nm, dos extratos das amostras de solos das minas de São Domingos.

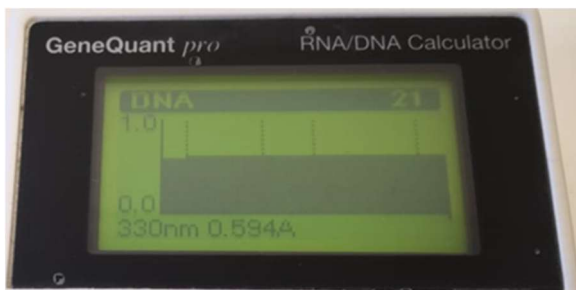


Figura 10.16 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de S. Domingos; SD₀ - Controlo.

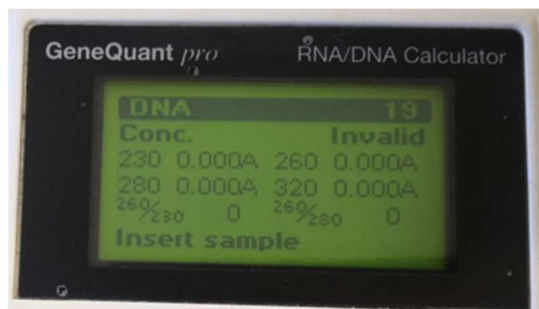


Figura 10.17 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de S.Domingos; SD₀ - Controlo.



Figura 10.18 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de S.Domingos; SD₁ - Solos tratados com cinzas de biomassa.

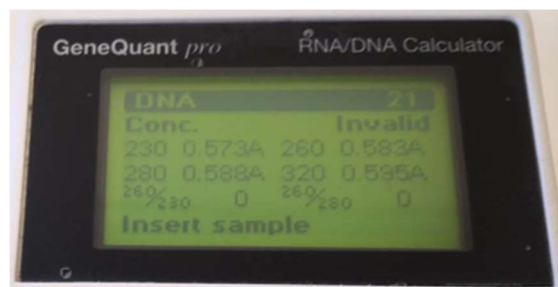


Figura 10.19 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de S.Domingos; SD₁ – Solos tratados com cinzas de biomassa.

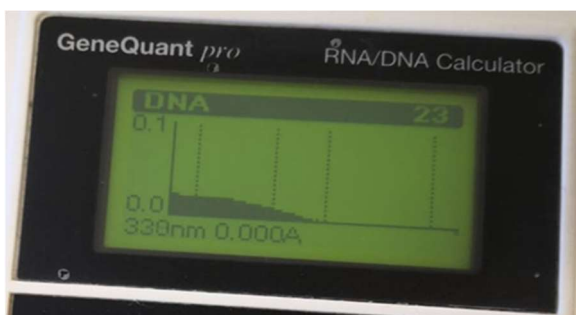


Figura 10.20 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de S. Domingos; SD₂ - Solos tratados com cinzas de biomassa granuladas e lamas celulósicas estabilizadas.

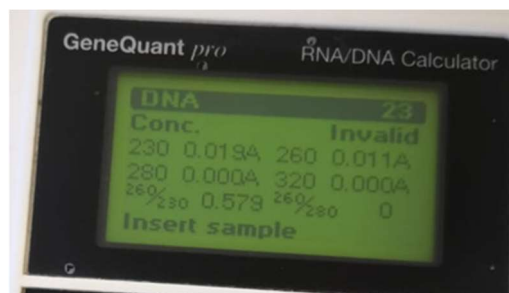


Figura 10.21 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de Lousall; SD₂ - Solos tratados com cinzas de biomassa granuladas e lamas celulósicas estabilizadas.

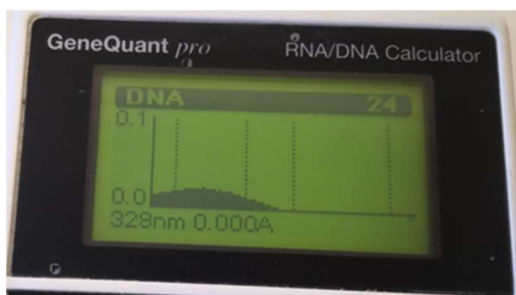


Figura 10.22 - Curva de absorvância de 230 a 320 nm, do extrato da amostra de solo das minas de S. Domingos; SD₃ - Solos tratados com cinzas de biomassa e lamas celulósicas não granuladas ou estabilizadas.

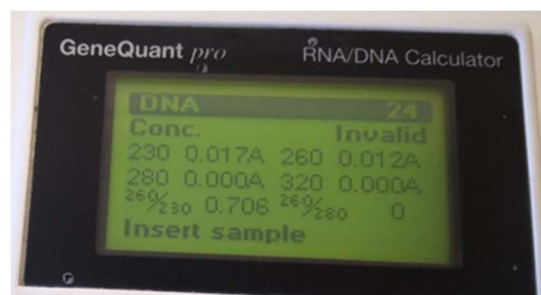


Figura 10.23 - Valores de absorvância a 230 a 320 nm para o extrato de solos de minas de S. Domingos; SD₃ - Solos tratados com cinzas de biomassa e lamasⁿ celulósicas não granuladas ou estabilizadas.

¹ As letras A, L e SD, corresponde às iniciais das minas, Aljustrel, Lousal e, São Domingos e os números, 1, 2 e 3, os tipos de tratamentos (GC, GC+LC e C+L, respetivamente). 0 - amostras de solos da mina utilizadas como controlo